



# Étude d'un complexe de trois protéines centrales de la division du pneumocoque: DivIB, DivIC et FtsL. Cible thérapeutique?

Audrey Le Gouellec

## ► To cite this version:

Audrey Le Gouellec. Étude d'un complexe de trois protéines centrales de la division du pneumocoque: DivIB, DivIC et FtsL. Cible thérapeutique?. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00303328

**HAL Id: tel-00303328**

**<https://theses.hal.science/tel-00303328>**

Submitted on 21 Jul 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

Spécialité : Biotechnologie santé et management

Présentée et soutenue publiquement par

**Audrey LE GOUËLLEC**

Le 28 Mai 2008

**Étude d'un complexe de trois protéines  
centrales de la division du pneumocoque:  
DivIB, DivIC et FtsL.  
Cible thérapeutique?**

**COMPOSITION DU JURY**

<b>Président</b>	Hans GEISELMANN, Université Joseph Fourier
<b>Rapporteurs</b>	Philippe NOIROT, INRA Nienke BUDELMEIJER, Institut Pasteur
<b>Examineurs</b>	Tanneke DEN BLAAUWEN, Swammerdam Institute for Life Sciences Daniel LADANT, Institut Pasteur
<b>Directeur de thèse</b>	Thierry VERNET, Institut de biologie structurale
<b>Co-directeur de thèse</b>	André ZAPUN, Institut de biologie structurale

Je suis réellement un homme quand mes sentiments, mes pensées et mes actes n'ont qu'une finalité: celle de la communauté et de son progrès.

Albert Einstein



Rien n'aurait été possible sans ton accueil, **Thierry**. Merci pour ta confiance et pour toutes nos discussions sur mon avenir professionnel. Tu sais combien j'ai apprécié ta diplomatie et ta franchise. Je n'oublie pas non plus avoir commencé jeune ados-adulte écoutant NRJ et partir en tant que jeune femme mariée et maman écoutant France Inter. MERCI de m'avoir fait GRANDIR.

En six ans, j'ai pu mesurer toute l'étendue de tes connaissances. Merci à toi, **André**, pour ton aide et tes conseils précieux durant ces trois années de thèse. Je garde en mémoire l'image d'un homme sensible avec une grosse carapace. En t'écoutant, j'ai énormément appris sur les gens et le monde en général. MERCI.

Merci à Mesdames **Nienke Buddelmeijer** et **Tanneke Den Blaauwen**, et Messieurs **Daniel Ladant**, **Philippe Noiro**t et **Johannes Geiselm**ann pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Evidemment, je tenais à vous remercier, **Marjolaine** et **Anne-Marie**.

Marjolaine, merci pour tes conseils, notamment pour les manips de stabilité de protéines et la rédaction du manuscrit. La vie ne serait pas grand-chose sans ces grands moments de bonheur, de rire et d'échange. Merci du fond du cœur pour tous ces instants passés ensemble. Anne Marie, je voulais te remercier pour ton soutien dans les moments difficiles (les petits moments de creux comme on dit). Tu as de très grandes qualités et des petits défauts. Je ne retiendrai que les grandes qualités. Pleines de talents au travail comme dans la vie, je t'admire pour toutes les choses que tu es capable de mener de front.

Rien que de petits conseils, mais quels conseils! Merci, **Benoit** pour tous ces petits trucs que tu as pu m'apprendre. Tu es à toi tout seul, la mine d'or du labo.

**Claire**, je tenais à te remercier pour tout ce que tu m'as enseigné à l'université. Si seulement tous les PROFs avaient ton PROFessionnalisme ! Qui sait tu es sûrement en grande partie responsable de ce que je suis devenue PROFessionnellement parlant. Merci beaucoup.

Il est inutile. Vous voyez de qui je vais parler ; **Soizic**, ma partenaire QLB. Non pas que tu es une personne inutile, bien au contraire. Tu restes à mes yeux quelqu'un d'unique. Et ça fait du bien de rencontrer des gens peu ordinaires. La vie est bien plus intéressante.

Evidemment je remercie tout le reste de l'équipe LIM. Quel bonheur de travailler dans une équipe pareil ! **Julien**, **Florent**, **Cécile F.**, **Elodie**, **Laure**, **Lamya** et ceux qui arrivent pour remplacer les anciens. Les soirées de « djeuns » (anniversaire, crémaillère, et les autres sans motifs particuliers). J'avais aussi envie de remercier chaleureusement tous les anciens qui sont

déjà parti construire leur avenir ailleurs comme **Raphaël, Cécile A. et Stéphanie**. Les soirées Badminton, le ski, l'escalade, les restos, les cinés, les concerts et tout le reste. Quels souvenirs ! Je n'oublierai jamais ces moments passés en votre compagnie.

**M**erci à toi **Régina** pour m'avoir ouvert les yeux sur le monde de l'Art en général. J'ai beaucoup appris en écoutant tes réunions de labo où tu avais beaucoup de mérite à essayer de nous expliquer l'art biologique. Je vous adore tous les trois.

**E**t je tenais à remercier toutes les autres personnes qui restent souvent dans l'ombre. Merci **Linda** de t'être occupé de tous ces papiers administratifs (contrats, carte de cantine et autres) Je sais mon dossier devenait vraiment encombrant. Merci à toi **Sylvie** pour toute la vaisselle que j'ai dû salir pendant toutes ces années.

**N**aturellement, je souhaite remercier toutes les autres personnes scientifiques ayant contribué à faire avancer ce projet ou d'autres projets non présentés dans ce manuscrit de thèse. Merci à **Nicole Thiellens** et **Gregory de Crescenzo** pour m'avoir initié à la technologie BIACORE. Je tenais à te remercier également **Guy Schoen** pour ta patience et tes manip pour le projet DivIVA. Merci à vous **Daphna Fenel** et **Elisabeth Hewatt** pour les manip de microscope électronique. Merci à l'équipe du LCM et plus particulièrement à **Andréa Dessen, Viviana Job,** et **Carlos Contreras-Martel** pour leurs conseils et questions lors de nos réunions conjointe LIM-LCM. Je n'oublie pas, **Daniela** et **Orietta** qui ont su m'inculquer les techniques relatives à la biologie du pneumocoque. Merci de m'avoir fait découvrir le sud de la Sardaigne, quel beau pays !

**T**ant de choses à vous dire et si peu de place pour en parler. Je vous aime tout simplement, **Papa et Maman.**

**S**ans **TOI**, la vie n'aurait sûrement pas été telle qu'elle est : un concentré de BONHEUR à l'état pur. Geronimo.

Au vu de ces remerciements, je m'aperçois que ces années ont été riches en rencontres. Finalement, toutes ces années passées m'ont appris la richesse des rapports humains et tant mieux !

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ASPRE</b>	active site serine penicillin recognizing enzyme
<b>bp</b>	paire de bases
<b>CD</b>	« chemically defined »
<b>CMI</b>	concentration minimale inhibitrice
<b>Da</b>	dalton
<b><i>dcw</i></b>	division and cell wall
<b>dNTP</b>	désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DO</b>	densité optique
<b>EDTA</b>	acide éthylène-diamine-tétraacétique
<b>Fts</b>	filamentous temperature sensitive
<b>GFP</b>	« Green Fluorescent Protein »
<b>GST</b>	glutathion S-transférase
<b>GT</b>	glycosyl-transférase
<b>HEPES</b>	acide [(hydroxyéthyl-2)-4-piperazinyl-1]- éthanesulfonique
<b>HMW</b>	« High Molecular weight »
<b>IPTG</b>	isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside
<b>L</b>	litre
<b>LB</b>	luria bertani
<b>LMW</b>	« Low molecular weight »
<b>M</b>	molaire
<b>μ</b>	micro
<b>mol</b>	mole
<b>mL</b>	millilitre
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine
<b>NAM</b>	acide <i>N</i> -acétyl-muramique
<b>NTA</b>	nitriolo-tri-acétique
<b>ONPG</b>	orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
<b>PAGE</b>	polyacrylamide gel electrophoresis
<b>PBP</b>	« penicillin binding protein »
<b>PBS</b>	« phosphate buffer saline »
<b>PCR</b>	« polymérase chain reaction »
<b>pH</b>	phosphate hydrogène
<b>rpm</b>	rotations par minute
<b>RU</b>	« response unit »
<b>SDS</b>	sodium-dodecyl-sulfate
<b>SPR</b>	surface plasmon resonance
<b>TP</b>	transpeptidase
<b>TH</b>	Todd Hewitt
<b>TEV</b>	Tobacco Etch Virus
<b>U</b>	unité





# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	<i>S. pneumoniae</i> de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d'après les données du CNRP (1984-1997 : P. Geslin ; 2001-2005, CNRP-ORP E. Varon, L. Gutmann.....13
Tableau 1.	Les protéines de la division comme cibles thérapeutiques potentielles.....15
Figure 2.	Représentation d'une coupe transversale d'une cellule d' <i>E. coli</i> en train de se diviser .....17
Figure 3.	Structure de la paroi, forme des cellules et division des bacilles <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .....18
Figure 4.	La division bactérienne durant plusieurs cycle de division consécutifs dans a) deux plans perpendiculaires (comme les <i>Neisseria</i> ou pédiocoques), b) trois plans perpendiculaires (comme les staphylocoques) ou c) un seul plan parallèle (comme les entérocoques ou streptocoques).....19
Figure 5.	Structure de la paroi, forme des cellules et division des coques <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....20
Figure 6.	Détermination du site de division chez <i>E. coli</i> . Le système Min et le système d'occlusion par les nucléoïdes.....24
Figure 7.	Représentation simplifiée de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.....32
Tableau 2.	Dépendance des protéines de la division pour leur localisation au site de division d' <i>E. coli</i> .....38
Tableau 3.	Dépendance des protéines de la division pour leur localisation site de division de <i>B. subtilis</i> .....39
Figure 8.	Le processus de recrutement au site de division d' <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .....39
Figure 9.	Carte d'interaction des protéines de la division chez <i>E. coli</i> .....40
Figure 10.	Principe des systèmes deux hybrides bactériens utilisés pour dresser la carte d'interactions des protéines impliquées dans la division.....41
Figure 11.	Modèle d'assemblage des protéines conservées du divisome.....43
Figure 12.	Topologie des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL chez <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>S. pneumoniae</i> .....46
Figure 13.	Représentation en ruban de la structure cristallographique du domaine périplasmique de FtsQ d' <i>E. coli</i> (résidus 58-260).....47
Figure 14.	Morphologie des cellules <i>E. coli</i> (38) (a) de souche sauvage cultivé en milieu LB à 30°C (b) souche <i>ftsQI(Ts)</i> cultivée à 30°C (c) <i>ftsQI(Ts)</i> cultivée à 37°C (d) <i>ftsQI(Ts)</i> cultivée à 42°C.....49
Figure 15.	Morphologie de la souche de <i>B. subtilis</i> déletée de <i>divIB</i> cultivée à 30°C.....50
Figure 16.	Phénotype des cellules d' <i>E. coli</i> déplétées de FtsL.....52
Figure 17.	Morphologies aberrantes liées à la déplétion de FtsL en milieu minimum chez <i>E. coli</i> .....52
Figure 18.	Phénotype des cellules de <i>B. subtilis</i> déplétées de FtsL.....53
Figure 19.	Phénotype des cellules d' <i>E. coli</i> déplétées de FtsB.....53
Figure 20.	Phénotype des colonies formées en présence (A) ou en absence (B) de FtsB sur milieu minimum.....53
Figure 21.	Phénotype de déplétion ou de surexpression de FtsQ chez <i>E. coli</i> .....54
Figure 22.	Schéma général de la protéolyse intramembranaire régulée.....56
Figure 23.	Schéma de dépendance des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB, FtsL et PBP2B/FtsI pour leur localisation au septum (en noir) et leur présence (en rouge) chez <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i> .....59

Figure 24.	Existence d'un complexe ternaire DivIB, DivIC et FtsL révélé par un système triple hybride de levure.....	60
Figure 25.	Domaines et épitopes importants pour la fonction de DivIB/FtsQ.....	63
Figure 26.	Quantification de PBP2x chez <i>S. pneumoniae</i> de souche R6 par Western blot.....	84
Tableau 4	Nombre de molécules de DivIB, DivIC, FtsL, PBP2x et PBP2x par unité formant colonie (UFC) de <i>S. pneumoniae</i> .....	85
Figure 27.	Modèle proposant pourquoi PBP2b est plus abondante que PBP2x chez le pneumocoque.....	85
Figure 28.	Principe de détection du système BIACORE® .....	87
Figure 29.	Sensorgramme type obtenu avec les surfaces NTA.....	91
Figure 30.	Sélection des données en vue de l'ajustement mathématique avec BIAevaluation 3.0.....	92
Figure 31.	Sensorgramme des cinétiques de fixation de DivIB sur H6K5FtsL/H6E5DivIC (courbes verte), sur H6E5DivIC (courbes bleues) et sur H6K5FtsL (courbes rouge).....	93
Figure 32.	Analyse des sensorgrammes de fixation de DivIB sur l'hétéro-dimère H6K5FtsL/H6E5DivIC par BIAevaluation 3.0.....	94
Figure 33.	Carte des plasmides pCI <sub>434</sub> et pCI <sub>p22</sub> .....	96
Figure 34.	Principe du triple hybride bactérien membranaire.....	97
Figure 35.	DivIB, DivIC et FtsL de <i>S. pneumoniae</i> forment un complexe ternaire.....	101
Figure 36.	Contrôle de la délétion de <i>divIB</i> chez <i>S. pneumoniae</i> .....	118
Figure 37.	Croissance automatisée de la souche sauvage R6 en milieu riche.....	118
Figure 38.	Croissance des souches R6, B2 en milieu riche (TH) et milieu défini (CD).....	119
Figure 39.	Morphologie des souches R6 et B2 par microscopie optique à contraste de phase.....	120
Figure 40.	Microscopie électronique des souches R6 et B2.....	120

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>11</b>
<b>A. LE PNEUMOCOQUE .....</b>	<b>11</b>
I. Un pathogène pour l'homme.....	11
II. Le problème de résistance aux antibiotiques.....	13
<b>B. LA DIVISION BACTERIENNE .....</b>	<b>17</b>
I. Division et morphogénèse.....	18
I.1 Les bacilles .....	19
I.2 Les coques.....	20
II. Sélection du site de division.....	23
II.1 Le système Min.....	24
II.2 Le système d'occlusion par les nucléoïdes .....	25
III. Assemblage de l'anneau FtsZ et constriction de la membrane.....	26
III.1 FtsZ.....	26
III.2 Mécanisme de constriction .....	27
III.3 Facteurs influençant la polymérisation de FtsZ .....	27
III.3.1 FtsA.....	27
III.3.2 ZipA .....	28
III.3.3 ZapA.....	29
III.3.4 FtsE/X .....	29
III.3.5 SepF(YlmF).....	30
III.3.6 SulA.....	30
III.3.7 EzrA .....	30
III.3.8 ClpX .....	31
IV. Coordination du processus de séparation des chromosomes et de division cellulaire.....	31
IV.1 FtsK .....	31
V. Synthèse de la paroi septale et protéines associées .....	32
V.1 La paroi bactérienne .....	32
V.1.1 Synthèse du peptidoglycane .....	34
V.1.2 Clivage du peptidoglycane et séparation des cellules filles .....	38
VI. Modèle d'assemblage du divisome .....	39
VI.1 Localisations et dépendances dans le recrutement au septum.....	39
VI.2 Interactions entre les différentes protéines du « divisome » .....	40
<b>C. DIVIB, DIVIC ET FTSL : UN COMPLEXE CENTRAL DE LA DIVISION .....</b>	<b>45</b>
I. Les acteurs : DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL .....	45
I.1 Découverte.....	45
I.2 Topologie et abondance .....	46
I.2.1 FtsL .....	46
I.2.2 DivIC/FtsB .....	47
I.2.3 DivIB/FtsQ .....	47
II. Les rôles cellulaires de DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL.....	43
II.1 Etude du phénotype des mutants : rôle dans la division cellulaire.....	43
II.1.1 Phénotype des mutants thermosensibles filamenteux .....	43
II.1.2 Phénotype des mutants de délétion.....	45
II.1.3 Phénotype des mutants de déplétion et de surexpression.....	52
II.2 Fonctions envisagées .....	55
III. Relation de DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL les unes avec les autres : stabilisation mutuelle .....	57
IV. Localisation et interdépendance pour leur recrutement au septum.....	59
V. Interactions .....	60
V.1 Méthodes biochimiques : interaction entre DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL ? .....	60
V.2 Test de double et triple hybride de levure et bactérien.....	61
V.3 Expériences de co-immunoprécipitation.....	62
VI. Dissection moléculaire du complexe.....	62

<b>PRESENTATION ET OBJECTIF DES TRAVAUX.....</b>	<b>67</b>
<b>CONTRIBUTIONS AUX TRAVAUX.....</b>	<b>69</b>
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°1 .....</b>	<b>71</b>
<i>In vitro</i> reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES D'INTERACTION DU COMPLEXE TERNAIRE PAR LA TECHNOLOGIE BIACORE® .....</b>	<b>89</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>89</b>
I. Principe du BIACORE® .....	89
II. Les puces de détection NTA .....	90
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>90</b>
I. Production des protéines recombinantes .....	90
I.1 Production et purification de H6K5FtsL.....	90
I.2 Production et purification de H6E5DivIC.....	91
I.3 Production et purification de DivIB recombinante.....	91
II. Le protocole expérimental.....	92
II.1 Cinétique de formation du complexe ternaire .....	92
II.2 Analyse des sensorgrammes .....	93
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>LES PROTEINES DIVIB, DIVIC ET FTSL DE <i>S. PNEUMONIAE</i> EXPRIMÉES CHEZ <i>E. COLI</i> FORMENT UN COMPLEXE TERNAIRE.....</b>	<b>97</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>97</b>
I. Principe du test double hybride bactérien de Di Lallo <i>et al</i> .....	97
II. Modifications apportées au système.....	98
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>99</b>
I. Clonage des gènes dans pCI <sub>434</sub> et pCI <sub>p22</sub> .....	99
I.1 Clonage dans le vecteur pET30b.....	99
I.2 Mutagenèse dirigée de <i>divIB</i> .....	100
I.3 Sous-clonage dans les vecteurs pCI <sub>434</sub> et pCI <sub>p22</sub> .....	100
II. Préparation des cellules R721 compétentes.....	101
III. Test β-galactosidase .....	101
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>102</b>
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°2 .....</b>	<b>105</b>
Roles of pneumococcal DivIB in cell division.	
<b>MATERIEL ET METHODES COMPLEMENTAIRES .....</b>	<b>119</b>
I. Automatisation de la mesure des courbes de croissance de <i>S. pneumoniae</i> .....	119
<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....</b>	<b>120</b>
I. Délétion de <i>divIB</i> .....	120
II. Automatisation de la mesure des courbes de croissance .....	120
III. Caractérisation du mutant nul <i>divIB</i> .....	121
III.1 Croissance du mutant nul pour <i>divIB</i> .....	121
III.2 Morphologie du mutant nul pour <i>divIB</i> .....	121
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>123</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>129</b>

## PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

### LE PNEUMOCOQUE

Il y a plus d'un siècle, George Miller Sternberg injectait sa propre salive à un lapin et retrouvait du pneumocoque dans l'animal abattu. Bien que de nombreuses expériences aient été réalisées depuis, l'étude d'aucun autre organisme a permis de mieux comprendre le phénomène d'infection bactérienne. En outre, l'étude du pneumocoque a été très importante dans l'accumulation des connaissances sur des domaines aussi variés que la nature du matériel génétique, la transformation naturelle comme moyen d'échange génétique, et le phénomène de résistance aux antibiotiques (248). Or, malgré l'accumulation de nombreuses connaissances sur ces sujets, il reste encore beaucoup de questions à élucider dans les domaines de la bactériologie, de l'immunologie, et de la vaccinologie chez le pneumocoque. Avec la sophistication des techniques modernes, répondre à ces questions pourrait fournir de nouvelles connaissances sur les relations entre l'homme et sa microflore, importantes notamment pour la prévention des maladies infectieuses à pneumocoque.

#### I. Un pathogène pour l'homme.

*Streptococcus pneumoniae*, ou pneumocoque est un coque à Gram positif d'aspect lancéolé. Il appartient à la division des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales*, à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*. Ce genre comprend actuellement 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et autres. *S. pneumoniae* est inclus dans l'ensemble des streptocoques oraux, mais reste associé aux streptocoques pyogènes pour son pouvoir pathogène (110). C'est une bactérie anaérobie facultative.

*S. pneumoniae* colonise de façon asymptomatique le nasopharynx. Il est présent dans 20 à 40% de la population (206). Mais sa « renommée » tient au fait que c'est une bactérie pathogène responsable d'une importante morbidité et mortalité, surtout dans les pathologies infectieuses pédiatriques. Selon l'OMS, *S. pneumoniae* cause la mort de plus d'un million de personnes par an dans le monde (151). Tout le paradoxe de cette bactérie réside dans ces deux mots : commensale et pathogène. L'étude de la biologie de ce micro-organisme est donc importante puisqu'elle permettrait d'améliorer les connaissances quant à l'étiologie des maladies à pneumocoque.

*S. pneumoniae* se transmet par contact direct avec les sécrétions respiratoires des personnes infectées ou bien des personnes porteuses asymptomatiques. Après cette mise en contact, il peut coloniser le nasopharynx de son nouvel hôte et peut rester ainsi pendant plusieurs semaines ou mois. De temps en temps, il peut échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et entraîner la maladie.

Les maladies à pneumocoque peuvent être classées en deux catégories : les infections invasives et non invasives. Parmi ces dernières, l'otite moyenne, la sinusite, la bronchite et la pneumonie non-bactériémique sont les manifestations les plus courantes et les moins graves. Par ailleurs, il existe trois grands types d'infections dites invasives, la pneumonie bactériémique, la méningite et l'infection systémique ou bactériémie, qui présentent un caractère de gravité plus important notamment chez les personnes présentant un déficit immunitaire, un dysfonctionnement de la rate, une défaillance organique chronique, et plus généralement les enfants de moins de 2 ans et les personnes de plus de 65 ans. Ainsi, on considère que chaque année dans le monde plus d'un million d'enfants de moins de 5 ans décèdent d'une infection respiratoire aiguë, dont la majorité est due à *S pneumoniae*. Les cas de pneumonies non invasives ou d'otites moyennes aiguës, qui bien que moins sévères, touchent également chaque année des millions d'enfants.

La pneumonie à pneumocoque est la plus courante des pneumonies bactériennes, et elle représente la majorité des pneumonies acquises en communauté. Elle peut-être sporadique mais elle est plus fréquente en hiver. Elle se caractérise par une fièvre élevée, des frissons et une toux productive associée à des douleurs pulmonaires et une difficulté respiratoire. Le taux de létalité associée est élevé, 10%, plus particulièrement chez les nourrissons de moins de 1 an et les personnes âgées ou présentant un facteur de risque. Une pneumonie mal traitée ou résistante aux antibiotiques peut se compliquer par extension extra-pulmonaire de l'infection.

La méningite à pneumocoque est au même titre que toutes les méningites bactériennes une urgence médicale, car celle-ci peut s'aggraver dramatiquement en quelques heures. Il n'est pas rare que des symptômes respiratoires ou un simple mal de gorge précède la fièvre, les maux de tête, vomissements, et parfois une raideur de la nuque. Chez les enfants plus âgés et les adultes, les signes de troubles de la conscience, une irritabilité, confusion ou somnolence peuvent aller jusqu'aux convulsions puis au coma. Dans le cas des nourrissons, le tableau clinique est moins prédictif. Le taux de mortalité associé à la méningite à pneumocoque est de 30%, mais peut aller jusqu'à 80% chez les personnes âgées.

L'infection systémique ou bactériémie à pneumocoque est en fait une complication des infections ORL non invasives, de la pneumonie ou de la méningite. Elle correspond à une dissémination générale de la bactérie dans l'organisme par le flux sanguin et aboutit souvent à une septicémie. Cette infection généralisée est d'autant plus grave quand elle atteint des personnes immunodéprimées. La mortalité est généralement de 20% et peut être plus élevée chez les patients à risques.

Moins fréquemment, le pneumocoque peut être impliqué dans l'arthrite infectieuse, l'ostéomyélite, l'endocardite, la péricardite, un abcès du système nerveux central, la conjonctivite ou l'infection urinaire.

## II. Le problème de résistance aux antibiotiques

En 1929, Alexander Fleming publie dans le « British Journal of Experimental Pathology » la découverte de la pénicilline isolée à partir du champignon *Penicillium notatum* (81). Howard Walter Florey et ses collègues de l'université d'Oxford démontrent plus tard l'efficacité antibactérienne de cette molécule *in vivo*. En 1935, Gerhard Domagk (Allemagne) synthétise le premier médicament antibactérien synthétique, le Prontosil, identifié plus tard comme étant un sulfanilamide par l'équipe de Daniel Bovet (Institut Pasteur). L'industrialisation de la pénicilline à partir des années 1940 pour usage médical, et ce dans le contexte de la seconde guerre mondiale, a eu un large impact sur le traitement de maladies infectieuses jusqu'alors mortelles. Les années suivantes ont été considérées comme les années fastes de l'antibiothérapie (1950-1970) avec l'espoir de voir la fin des maladies infectieuses. La production de la pénicilline a été rapidement suivie par la découverte et le développement d'un grand nombre d'antibiotiques qui représentent encore aujourd'hui la plupart des classes d'antibiotiques, les tétracyclines, macrolides, aminoglycosides, céphalosporines, chloramphénicol, glycopeptides, et rifamycines (78).

Cependant, la résistance aux antibiotiques est un phénomène inéluctable, due à l'évolution des bactéries sous la pression de sélection des antibiotiques. Ce phénomène est particulièrement rapide chez certaines bactéries, comme *S. pneumoniae*, qui ont la capacité d'échanger avec d'autres espèces bactériennes proches du matériel génétique codant, entre autre, pour des marqueurs de résistance. Le pneumocoque acquiert des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques : aux sulfamides en 1943, à la tétracycline en 1963, à l'érythromycine en 1967 et au chloramphénicol en 1970 (Klugman, 1990). Les premiers signes de résistance à la pénicilline chez le pneumocoque apparaissent en 1965 à Boston. La première souche multi-

résistante est découverte, en 1977, en Afrique du Sud (137). La résistance à la pénicilline se propage rapidement à travers le monde dans les années 1980, particulièrement en Afrique du Sud, en Espagne, en Hongrie et en France. En 2002, 53% des souches isolées en France sont de sensibilité réduite à la pénicilline G (255).

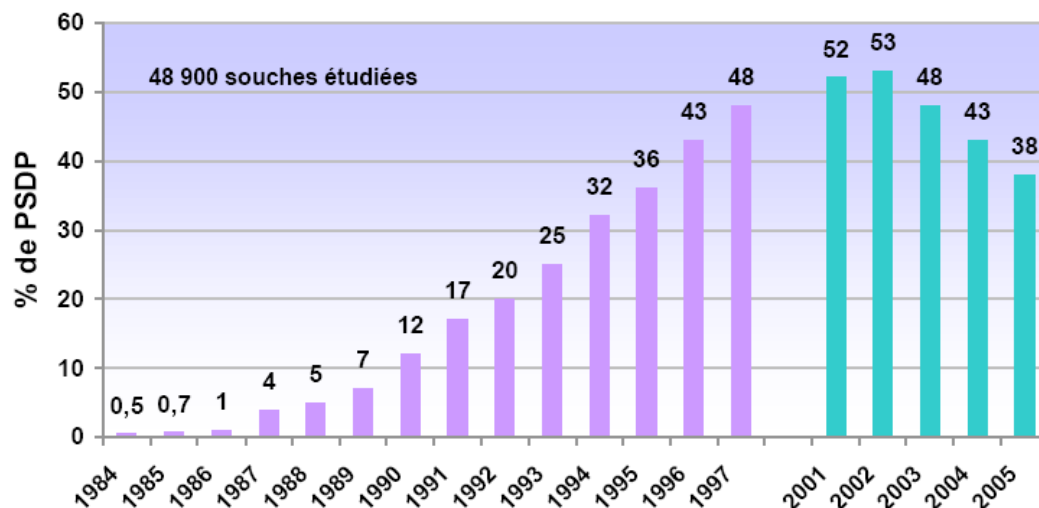


Figure 1. *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d'après les données du CNRP (1984-1997 : P. Geslin ; 2001-2005, CNRP-ORP E. Varon, L. Gutmann) D'après (255)

Depuis, sans doute grâce à la campagne d'information visant à diminuer la consommation d'antibiotiques en France, le taux de pneumocoques résistants diminue (Figure 1). Ceci est positif mais l'apparition de souches multi-résistantes demeure un véritable problème de santé publique. En 2005, sur 1434 souches pour lesquelles 6 marqueurs de résistance ont été testés, 34% sont multi-résistantes c'est-à-dire résistante à au moins trois antibiotiques (255). Ces souches ne se cantonnent pas aux hôpitaux mais elles apparaissent et s'étendent dans la communauté. Les flux migratoires et touristiques contribuent largement à leur dissémination (78).

Face au développement de ces souches multi-résistantes, il est nécessaire de trouver de nouveaux antibiotiques. Ceux utilisés aujourd'hui dans le traitement des maladies infectieuses ciblent en majorité l'un des 4 processus suivant : la synthèse des protéines, la synthèse d'ADN, la synthèse de la paroi ou la synthèse du folate (259). Mais la course que nous menons contre les pathogènes nous pousse à développer de nouveaux médicaments ayant un mode d'action inédit. La division bactérienne est un processus essentiel. Plusieurs aspects des protéines de la division suggèrent qu'elles sont de bonnes candidates comme cibles antibactériennes (Tableau 1). Premièrement, elles sont souvent essentielles pour la propagation et la viabilité des bactéries, et par conséquent essentielles pour le processus infectieux. Deuxièmement, elles sont présentes dans la majorité des pathogènes (156) et sont



pratiquement toutes absentes chez l'humain (Tableau 1). Certaines protéines comme FtsZ et FtsA ont des homologues chez l'homme, respectivement la tubuline et l'actine. Cependant, les inhibiteurs spécifiques de ces protéines de la division ne semblent pas perturber les homologues humains (156). Un troisième avantage des protéines de la division comme cibles thérapeutiques est leur accessibilité. La majorité d'entre elles sont membranaires et sont par conséquent partiellement exposées à l'extérieur de la cellule. Les composés inhibiteurs n'auront pas à traverser la membrane cytoplasmique, une étape obligatoire et souvent rédhibitoire pour cibler des processus cytoplasmiques. Des données de structure tridimensionnelle existent pour la majorité d'entre elles (Tableau 1). L'utilisation de ces données structurales, notamment pour FtsZ et ZipA a permis d'identifier de nouvelles molécules candidates pour une antibiothérapie (247). Beaucoup de ces protéines n'ont pas d'activité catalytique connue. Cependant, certaines comme FtsZ, FtsE et FtsA ont des domaines qui lient le GTP ou l'ATP qui peuvent être ciblés par des inhibiteurs. Par ailleurs, il existe beaucoup d'interactions protéine-protéine, essentielles à la division. Ceci inclut des interactions entre les protéines intracellulaires FtsZ et les protéines modulant sa polymérisation, et des interactions extracellulaires entre des protéines membranaires. Les interfaces protéine-protéine contiennent souvent un groupe compact de résidus, appelé « hot spot » critiques pour l'affinité de l'interaction (156). Il est donc possible d'inhiber des interactions protéine-protéine avec de petites molécules ciblant ces régions particulières.

Le pneumocoque est un pathogène responsable de plus d'un million de morts par an à travers le monde. Les souches multi-résistantes sont un réel problème de santé publique. Par conséquent, il est urgent de mieux gérer l'utilisation des antibiotiques disponibles et de renforcer notre arsenal thérapeutique par de nouvelles molécules. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Une première solution consiste à élucider les mécanismes de résistance dans le but d'améliorer les antibiotiques actuels afin de rétablir leur efficacité. Une deuxième solution consiste à identifier de nouvelles cibles potentielles au sein de voies métaboliques essentielles à la bactérie, et concevoir ou trouver des molécules qui les inhibent.

	Présence chez			Homologue chez <i>Homo sapiens</i>	Essentialité chez Ec, Bs et Sp	Interaction(s)	Site actif ou de liaison d'un ligand	Structure
	<i>Ec</i>	<i>Bs</i>	<i>Sp</i>					
FtsZ	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b> <sup>(193)</sup>	<b>oui</b>	<b>FtsA, ZapA, ZipA, FtsE, FtsK</b>	<b>oui</b>	<b>Oui</b> <sup>(159)</sup>
FtsA	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b> <sup>(20, 253)</sup>	<b>non</b>	<b>FtsZ</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b> <sup>(20, 253)</sup>
ZapA (YshA)	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>FtsZ</b>	<b>non</b>	<b>Oui</b> <sup>(158)</sup>
SepF (YlmF)	<b>non</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>FtsZ</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
ZipA	<b>oui</b>	<b>Non</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsZ</b>	<b>non</b>	<b>Oui</b> <sup>(181)</sup>
EzrA	<b>non</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>FtsZ</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
ClpX	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>FtsZ</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>
SulA	<b>oui</b>	<b>Non</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	-	<b>FtsZ</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b> <sup>(45)</sup>
FtsE	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>oui</b>	<b>*non</b>	<b>FtsX, FtsZ</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>
FtsX	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>*non</b>	<b>FtsE</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
FtsK	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>FtsZ, FtsL</b>	<b>non</b>	<b>Oui</b> <sup>(172)</sup>
FtsQ (DivIB)	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>FtsB et FtsL, FtsI, FtsW, FtsN</b>	<b>non</b>	<b>oui</b> <sup>(212, 254)</sup>
FtsL	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsQ et FtsB</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
FtsB (DivIC)	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsQ et FtsB</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
FtsW	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsI, FtsZ, FtsQ, FtsL, FtsN</b>	<b>non</b>	<b>non</b>
FtsI	<b>oui</b>	<b>Oui</b>	<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsW, FtsQ, FtsN</b>	<b>oui</b>	<b>Oui</b> <sup>(194)</sup>
FtsN	<b>oui</b>	<b>Non</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>	<b>FtsQ, FtsI, FtsW</b>	<b>non</b>	<b>Oui</b> <sup>(270)</sup>
AmiC	<b>oui</b>		<b>non</b>	<b>non</b>	-	-	<b>oui</b>	<b>Oui</b> <sup>(195)</sup>
EnvC	<b>oui</b>		<b>oui</b>	<b>non</b>	<b>non</b>	-	<b>oui</b>	<b>non</b>

Tableau 1. Les protéines de la division comme cibles thérapeutiques potentielles. Le nom entre parenthèse est celui de l'orthologue chez *B. subtilis* et/ou *S. pneumoniae*. Pour tester la présence d'un homologue chez l'homme, les séquences des protéines de la division d'*E. coli* (ou *B. subtilis* quand la protéine est absente chez *E. coli*) ont été utilisées pour réaliser une recherche blastp dans la base de données des protéines *Homo sapiens* sur le site <http://www.expasy.org/tools/blast/>. « oui » indique la présence d'un homologue probable, définit comme ayant une similarité de séquence avec un E-value de  $10^{-3}$  ou moins. Pour certaines protéines une homologie structurale (plutôt que de séquence) est connue. Dans ce cas, les références sont citées. Pour l'essentialité, « oui » indique que la protéine est essentielle dans tous les organismes dans lesquels elle est présente. « non » indique qu'elle n'est pas essentielle au moins dans un de ces trois organismes, bien que présente, ou dans certaines conditions de culture. \* FtsE et X sont essentielles chez *E. coli* à basse concentration en sel. Pour le site actif ou la liaison d'un ligand, « oui » indique qu'il existe dans la protéine, « non » indique qu'il n'a pas encore été identifié. Les propriétés des protéines favorables à leur utilisation en tant que cible thérapeutique sont soulignées. (D'après Lock et Harry, 2008)

## LA DIVISION BACTERIENNE

La division cellulaire est un processus biologique fondamental, permettant la propagation des espèces vivantes. C'est un phénomène complexe et fascinant. Le mécanisme de division des cellules est conceptuellement similaire chez les procaryotes et les eucaryotes. Le principal avantage d'étudier la division chez les procaryotes tient à sa relative simplicité, bien que le mécanisme s'avère plus complexe que ce qui était pensé au départ. La plupart des bactéries croissent et se divisent selon un mode de fission binaire, c'est-à-dire qu'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles de taille et de forme identique. La division bactérienne a été décrite principalement chez deux organismes modèles *Escherichia Coli* et *Bacillus subtilis*. Lors de la division, les processus de constriction de la membrane cytoplasmique, de ségrégation des nucléoïdes et de synthèse de la paroi septale doivent être coordonnés dans l'espace et dans le temps (24, 165).

La découverte des acteurs moléculaires de la division bactérienne s'est faite essentiellement chez *E. coli* par des études génétiques de mutants conditionnels thermosensibles, *fts*, pour « Filamentous ThermoSensitive mutant » (123). Ce terme provient de la morphologie filamenteuse qu'adopte la bactérie *E. coli*, lorsque ces mutants sont cultivés à une température non permissive. Dans ces mutants, la division est bloquée mais la synthèse d'ADN et la ségrégation des nucléoïdes ne sont pas altérées. Lorsque la température permissive est rétablie, les cellules forment des septa à l'endroit où elles auraient dû le faire normalement en conditions non restrictives. Chez *B. subtilis*, la découverte des gènes impliqués dans l'initiation de la division s'est faite grâce à la découverte des mutants thermosensibles *divI*, (pour « initiation de la division ») (177). Chez ces deux organismes, les études génétiques classiques, l'utilisation de nouveaux outils comme la microscopie à fluorescence et la bioinformatique ont conduit à la découverte d'une dizaine de protéines conservées qui jouent un rôle dans le processus de division bactérienne. Ces protéines constituent le divisome, qui se définit comme un ensemble de protéines localisées au site de division participant à la formation du septum de division. Certaines protéines comme FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ/DivIB, FtsL, FtsB/DivIC, FtsW et FtsI sont très conservées et présentes dans quasiment toutes bactéries à paroi cellulaire, d'autres protéines peuvent ou non être impliquées (Tableau 1 et Figure 2). Ces différences pourraient refléter les variations de forme des bactéries et de structure de leur enveloppe. Par exemple, les bactéries du genre *Mycoplasme* n'ont pas de paroi et n'ont besoin que d'un système de constriction de la membrane. Leur génome contient quelques gènes conservés de la division, dont *ftsZ* (156).

La présence de FtsZ au site de division est requise pour le positionnement des autres protéines, ce qui a conféré à FtsZ un statut particulier dans la littérature concernant la division bactérienne. FtsZ est généralement considérée comme l'organisatrice du divisome. Des processus de régulation existent pour moduler le divisome (son assemblage, son positionnement et son désassemblage). Certains seront abordés ci-dessous. Il existe également d'autres systèmes de régulation transcriptionnelle, traductionnelle ou encore indépendant de la réponse SOS qui ne seront pas détaillés ici (voir pour cela les revues suivantes (111, 214).

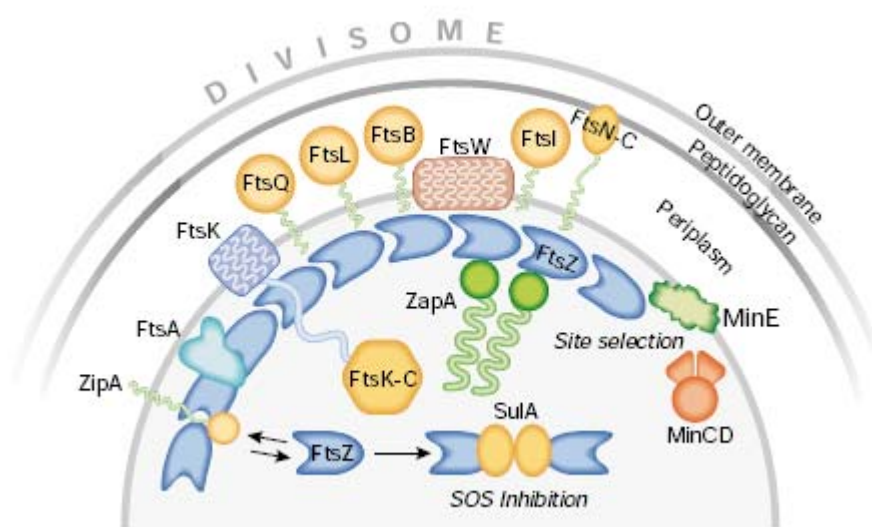


Figure 2. Représentation d'une coupe transversale d'une cellule d'*E. coli* en train de se diviser. Les protéines qui se localisent au site de division et constituent le divisome, sont montrées. Certains événements qui pourraient moduler l'assemblage de l'anneau FtsZ, comme le processus de sélection du site de division et de réponse SOS inhibant la division, sont montrés également. (D'après Vicente et Lowe, 2003)

DivIB/FtsQ, FtsL et DivIC/FtsB étant au centre de mon travail de thèse, une section entière (section C) leur est consacrée.

## I. Division et morphogénèse

La division bactérienne est étudiée depuis de nombreuses années chez deux bactéries *E. coli* et *B. subtilis*. Historiquement, c'est le développement de multiples outils de génétique qui a facilité la réalisation des expériences et permis de proposer des modèles du mécanisme de division de ces deux bacilles (66, 76, 90). Depuis quelques années, la pertinence de ces modèles est examinée dans d'autres bactéries qui présentent d'autres formes. *Caulobacter crescentus*, une bactérie en forme de croissant, est devenue, entre autre, un modèle d'étude pour la compréhension du processus de morphogénèse (74).

### I.1 Les bacilles

Les bactéries en forme de bâtonnet, comme *E. coli* ou *B. subtilis* ont au moins deux modes de synthèse de la paroi. Durant une phase d'élongation, la paroi croît de façon latérale, parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule. Puis, à un moment précis du cycle cellulaire, les cellules fabriquent une paroi septale au niveau du site de division, perpendiculairement à l'axe longitudinal (Figure 3). Par conséquent, les bactéries en forme de bâtonnet requièrent un mécanisme de régulation du jeu d'enzymes responsable des synthèses latérale et septale de la paroi (voir section B.V.1). Les mutations qui affectent spécifiquement les protéines responsables de la septation, sans altérer la croissance latérale et la ségrégation des nucléoïdes, entraînent la filamentation des cellules.

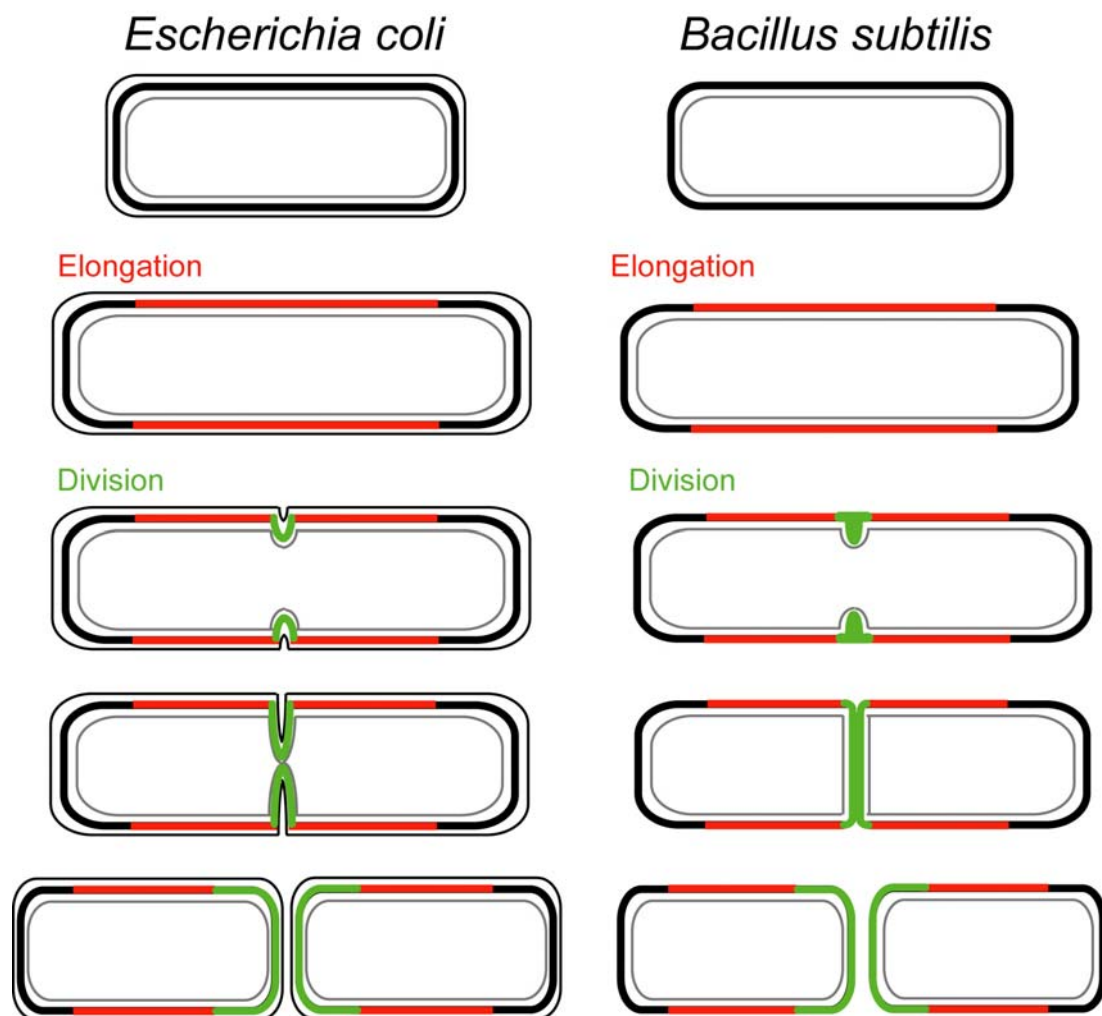


Figure 3. Structure de la paroi, forme des cellules et division des bacilles *E. coli* et *B. subtilis*. La croissance latérale de la paroi, dite phase d'élongation est représentée en rouge. Lors de la division, la synthèse de la paroi septale est représentée en vert. Trait gris fin : membrane cytoplasmique. Trait noir fin : membrane externe. Trait noir épais : PG. Chez *E. coli*, la paroi nouvellement formée se sépare progressivement au cours de la division. Chez *B. subtilis*, la séparation se fait après formation d'un septum transversal complet. (D'après Goehring et Beckwith, 2005)

Génétiquement, il est assez facile de convertir une bactérie en forme de bâtonnet en une sphère, par exemple, par la répression (*rodA*, *pbpA*) ou la surexpression (*bolA*) de gènes (5, 120, 186). En revanche, aucune étude ne relate d'altération génétique stable transformant une bactérie sphérique en une bactérie en forme de bâtonnet (275).

## I.2 Les coques

Parmi les coques, on distingue deux classes (275):

- a) Les organismes complètement sphériques comme les pédiocoques, microcoques, deinocoques, staphylocoques ou *Neisseria* se divisent selon deux ou trois plans perpendiculaires consécutifs conduisant à la formation de tétrade ou de formes cuboïdes constituées de huit cellules, respectivement (Figure 4a et 4b).
- b) Les ovocoques, organismes en forme de ballon de rugby, comme les streptocoques (*S. pneumoniae*), entérocoques et lactocoques, se divisent selon des plans parallèles perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule (Figure 4c). Selon le degré de séparation des cellules, on peut trouver des cellules seules isolées, des diplocoques et des chaînettes plus ou moins longues.

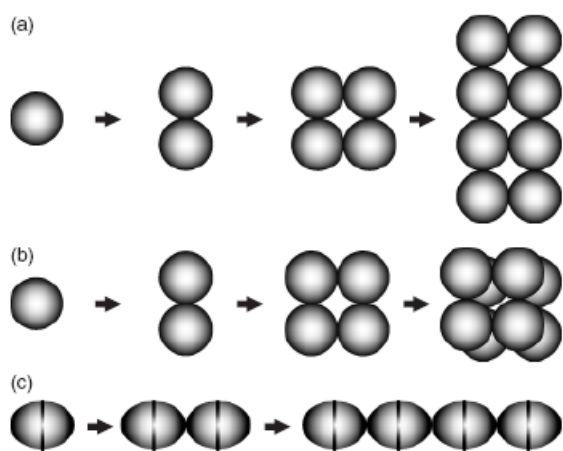


Figure 4. La division bactérienne durant plusieurs cycle de division consécutifs dans a) deux plans perpendiculaires (comme les *Neisseria* ou pédiocoques), b) trois plans perpendiculaires (comme les staphylocoques) ou c) un seul plan parallèle (comme les entérocoques ou streptocoques). Zapun *et al.*, 2008

Chez les ovocoques, des expériences utilisant la vancomycine fluorescente, permettant de visualiser spécifiquement le PG nouvellement formé ou son précurseur, démontrent que la synthèse de PG se fait au site de division. Chez *S. pneumoniae*, ces expériences de marquage avec la vancomycine fluorescente ont confirmé des études précédentes utilisant indirectement les protéines ou acides teichoïques attachés au PG montrant la synthèse de la paroi au site de division (50, 189).

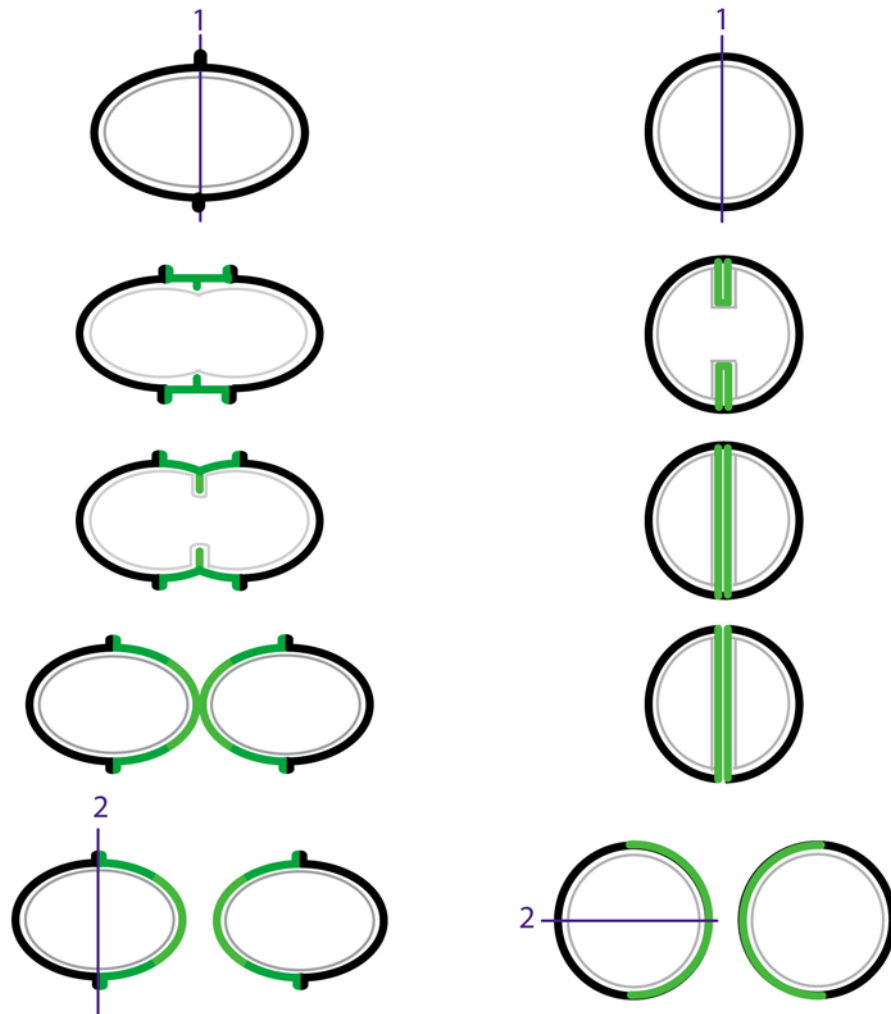
*Streptococcus pneumoniae**Staphylococcus aureus*

Figure 5. Structure de la paroi, forme des cellules et division des coques *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. La synthèse septale de la paroi est représentée en vert clair. Chez les ovocoques comme *S. pneumoniae*, une synthèse périphérique de PG est représentée en vert foncé. Trait gris fin : membrane cytoplasmique. Trait noir épais : PG. Les plans de division successifs sont représentés par un trait bleu. (D'après Zapun *et al.*, 2008)

Les ovocoques comme *S. pneumoniae* synthétisent de façon centripète la paroi dans la zone équatoriale pour former le septum de façon perpendiculaire à l'axe longitudinal de la cellule. Dans les deux cellules filles en division, un épaissement de la paroi (anneau équatorial) est présent au futur site de division des cellules. Cette excroissance se clive en deux et les deux moitiés se séparent l'une de l'autre symétriquement lors de la croissance et de la division des cellules filles (Figure 5). Les excroissances ou anneaux équatoriaux divisent le pneumocoque en deux hémisphères qui diffèrent en âge par un temps de génération. (28).

Les coques sphériques comme *Staphylococcus aureus* synthétisent de façon centripète une nouvelle paroi à partir d'un anneau équatoriale (Figure 5). La scission de cette nouvelle paroi va générer les deux nouveaux pôles des cellules filles. Après division, une nouvelle bande équatoriale perpendiculaire à la précédente est formée au milieu des cellules filles et le processus se répète.

Le PG, composant de la paroi bactérienne, est un facteur déterminant de la morphologie des bactéries, agissant comme un exosquelette souple. Il est constitué de chaînes de sucres reliées entre elles par des ponts peptidiques (voir section B.V.1). Ce réseau constitue une énorme molécule, le sacculus, qui entoure entièrement la cellule (124). Le sacculus isolé conserve la forme de la bactérie initiale (66, 124 ) et la plupart des mutations responsables d'un changement de forme des cellules sont localisées dans des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi (120, 125, 232, 239).

Cependant, certaines bactéries dépourvues de paroi, peuvent avoir des formes variées sur la base de leur structure interne (215). L'existence d'un cytosquelette bactérien est d'ailleurs maintenant clairement établi (201). Il est probable que certains membres du cytosquelette comme FtsZ, homologue de la tubuline, dirige directement ou non les machineries de synthèse du PG. Chez *S. aureus*, par exemple, on peut observer que la localisation de la synthèse de PG septal est dépendante de FtsZ. L'utilisation de vancomycine fluorescente démontre que la synthèse de PG s'effectue majoritairement au site de division. Quand FtsZ est absente, le septum n'est plus formé et la synthèse de PG n'est plus localisée au site de division mais s'étend à toute la cellule entraînant une augmentation du volume d'un facteur huit, avant la lyse (199).

Chez les ovocoques, il existe probablement deux machineries de synthèse du PG. Un premier modèle envisageait un unique site de synthèse septale centripète avec un clivage de la paroi par des hydrolases conduisant à la formation de la paroi périphérique (121). Cependant, des mesures précises des surfaces des parois septale et périphérique ont montré que la paroi périphérique croît plus vite que ce qui est possible dans le modèle de clivage. Un second modèle fût donc proposé qui implique l'existence d'une autre machinerie de synthèse du PG périphérique, qui fonctionne diffusément selon un gradient ayant un maximum d'activité près du site de clivage du PG septal (122). Cette idée selon laquelle les ovocoques ont deux machineries de synthèse du PG, alors que les coques sphériques n'en ont qu'une, provient également d'études de mutagenèse et de l'utilisation d'inhibiteurs (155). Des mutations thermosensibles chez la plupart des ovocoques testés, transforment ces ovocoques en



bactéries en forme de bâtonnet. L'utilisation d'antibiotiques qui bloquent la septation conduit également à des cellules plus longues, sans septa. En revanche, ce type de morphologie n'a jamais été observé avec des coques sphériques, comme les staphylocoques et *Neisseria*. Ceci indique qu'il existe probablement deux machineries de synthèse du PG chez les ovocoques, et une seule chez les bactéries vraiment sphériques. Suivant les termes utilisés par Higgins et Shockman en 1976, les ovocoques auraient donc une synthèse septale, conduisant à la formation du septum perpendiculairement à l'axe longitudinal, et une synthèse périphérique dans l'axe longitudinal (Figure 5). Ces deux machineries de synthèse seraient spécifiques de la division des ovocoques. Certains résultats suggèrent que ces deux types de synthèses pourraient également opérer lors de la division des bâtonnets. L'élongation des bactéries en forme de bâtonnet serait un troisième type de synthèse distincte de la synthèse périphérique (275).

L'essentiel de nos connaissances sur la division bactérienne dérive des travaux réalisés sur deux bacilles : *E. coli* et *B. subtilis*. Le Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules est un des rares laboratoires étudiant la division chez une bactérie dont la complexité morphologique est intermédiaire entre celle des bacilles et celle des coques strictes : l'ovocoque pathogène *S. pneumoniae*. A terme, la comparaison des mécanismes moléculaires de la division chez des bactéries ayant des morphologies différentes devraient éclairer le rôle des protéines intervenant dans ce processus et offrir des possibilités d'interventions thérapeutiques originales.

## II. Sélection du site de division

La première étape de la division consiste en la mise en place de la machinerie de division à un endroit précis de la cellule, la plupart du temps, au centre de la cellule mère, à équidistance des deux pôles. De nombreux acteurs de ce positionnement sont connus, mais la description détaillée des mécanismes moléculaires qui dictent où, quand, et comment cette machinerie se met en place, restent vagues. Néanmoins, deux mécanismes distincts contribuent au positionnement précis de la machinerie de division, le système Min et le système d'occlusion par les nucléoïdes (7, 111).

## II.1 Le système Min

Le système Min a été découvert il y a plus de 30 ans lors de l'étude de mutant *min* chez *E. coli* et *B. subtilis* (111). Le système Min prévient la formation du septum près des pôles de la cellule (163).

Chez *E. coli*, le locus *min* contient les trois gènes *minC*, *minD*, et *minE* qui sont organisés en opéron (111). Les cellules déletées de *minCDE* forment des mini cellules sans ADN (7). L'oscillation d'un pôle à l'autre de la cellule des trois composantes du système, MinC, MinD et MinE, permettrait le positionnement correct de l'anneau Z au centre de la cellule (112, 169). MinC est un dimère inhibant la polymérisation de FtsZ (130), il interagit avec MinD, qui est une ATPase liée à la membrane (59), pour former le complexe MinCD, régulateur négatif de l'assemblage de l'anneau FtsZ (60, 129). MinE est un dimère qui formerait une structure annulaire oscillant alternativement d'une position proche du site de division à l'un des deux pôles de la cellule (Figure 6) (111). MinD est nécessaire à la localisation de MinE au milieu de la cellule (17). Le déplacement de MinE est accompagné du départ du complexe MinCD qui se ré-assemble alors au pôle opposé de la cellule, l'oscillation de MinCD qui en résulte provoque la dissociation des polymères de FtsZ. Le complexe MinCD balaye ainsi toute la surface de la membrane cytoplasmique exceptée la zone avoisinant le site de division, au niveau de laquelle FtsZ peut polymériser pour former un anneau stable (112, 169).

Des expériences de localisation par différents laboratoires utilisant le marquage fluorescent GFP de MinC, MinD et MinE dans des cellules vivantes ont montré l'oscillation de ces trois protéines dans les cellules (111). Des images à haute résolution ont montré leur organisation hélicoïdale (225). Une telle structure jouerait un rôle important dans la dynamique du système Min.

Chez *B. subtilis*, des homologues de MinC et MinD existent. En revanche, MinE est absente et l'oscillation de MinD n'a jamais été observée (7). Une autre protéine, DivIVA est responsable du contrôle de l'activité de MinCD. DivIVA et MinE n'ont aucune similarité de séquence. Leur structure quaternaire et leur fonction sont différentes (7). DivIVA est localisée aux pôles de la cellule, où elle recrute MinCD, probablement par une interaction directe avec MinD. Elle peut également se localiser au site de division tardivement et interviendrait dans la maturation des pôles durant la division végétative. Sa localisation au site de division dépend de FtsZ et d'autres protéines de la division (7). Contrairement à la plupart des protéines de la division, DivIVA reste présente aux pôles de la cellule après la division. La localisation polaire de DivIVA est indépendante des protéines du cytosquelette Mbl et MreB (108). Il a

été proposé que DivIVA en s'oligomérisant adopterait une forme courbée qui reconnaîtrait la morphologie des pôles des cellules (235). Comme chez *E. coli*, l'anneau FtsZ se positionne au milieu de la cellule avec un haut degré de précision. Or, chez *B. subtilis* cette localisation précise de l'anneau FtsZ est indépendante du système Min (179). Chez *B. subtilis*, le système Min empêcherait la polymérisation de l'anneau FtsZ aux pôles de la cellule durant la division végétative (7).

De nombreuses espèces comme *Caulobacter*, *Haemophilus influenzae*, *Streptomyces*, les mycoplasmes et *S. aureus* ou *S. pneumoniae* sont dépourvus d'homologues des Min (111). Il a d'ailleurs été démontré que le système Min n'est pas essentiel pour tous les organismes. On vient de voir que chez *B. subtilis*, le système Min servirait à prévenir la formation de polymère de FtsZ aux pôles. Un autre mécanisme doit donc exister pour assurer le positionnement précis de ce polymère au site de division (111).

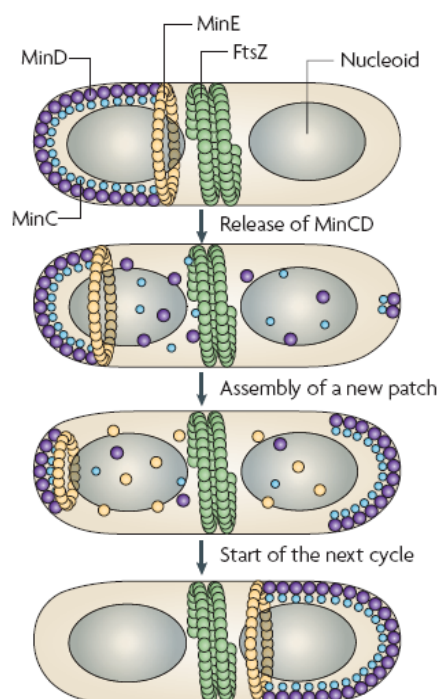


Figure 6. Détermination du site de division chez *E. coli*. Le système Min et le système d'occlusion par les nucléoïdes. Dans une cellule prête à se diviser, les nucléoïdes (en gris) bloquent la division dans leur proche voisinage, l'anneau Z (en vert) ne peut plus s'assembler qu'aux pôles ou dans la région centrale de la cellule. MinCD (en violet) est un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ et s'associe à la membrane cytoplasmique à l'un des deux pôles de la cellule. L'oscillation de l'anneau de MinE (en jaune) provoque la dissociation membranaire de MinCD qui migre alors au pôle opposé de la cellule pour s'associer de nouveau à la membrane. L'anneau Z ne peut se stabiliser qu'au site de division qui n'est pas balayé par le complexe MinCD. (Thanbichler *et al.*, 2008)

## II.2 Le système d'occlusion par les nucléoïdes

Ce modèle, postulé par Woldringh (268) propose que le site de division se met en place là où les nucléoïdes sont absents (Figure 6). Dans des cellules anucléées, générées par interférence avec la ségrégation des nucléoïdes, l'anneau FtsZ est positionné près du milieu des cellules, bien que le positionnement ne soit pas aussi précis que dans les cellules nucléées (163). De plus, dans un mutant *min*, l'anneau FtsZ ne se positionne pas au hasard mais aux

pôles de la cellule et entre les nucléoïdes. Ces résultats suggèrent que l'occlusion par les nucléoïdes agit au moment de la formation de l'anneau FtsZ. Deux protéines ont récemment été identifiées comme étant en partie responsables de l'occlusion par les nucléoïdes, Noc chez *B. subtilis* (269) et SlmA chez *E. coli* (17). Cependant, des mutants *noc<sup>-</sup> minD<sup>-</sup>* ou *slmA<sup>-</sup> min<sup>-</sup>* présente encore une polymérisation de l'anneau FtsZ entre les deux chromosomes séparés. Il apparaît donc que d'autres facteurs puissent intervenir. En outre, il n'existe pas d'homologue de SlmA ou Noc chez *Streptomyces* (111), organisme qui ne comporterait pas de système Min. Ceci indique, qu'au moins dans cet organisme, il doit exister d'autre(s) mécanisme(s) assurant le positionnement correct de l'anneau FtsZ.

### III. Assemblage de l'anneau FtsZ et constriction de la membrane

#### III.1 FtsZ

FtsZ est sans doute l'élément le plus critique de la machinerie de division et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est le plus largement conservé, étant présent dans la quasi-totalité des eubactéries, la plupart des archaebactéries, et dans de nombreuses organelles eucaryotes (170). Deuxièmement, il est au sommet de la hiérarchie de l'assemblage des protéines de la division (voir section B.VI). Elle a été la première protéine identifiée comme *fis* montrant une localisation au site de division (18). Elle se localise en une structure hélicoïdale probablement avant et indépendamment de la formation de l'anneau septal (196). C'est une protéine cytoplasmique essentielle (200) d'environ 40 kDa. FtsZ possède une activité GTPase (182, 184) et est l'homologue de la tubuline (159, 193). Elle a la capacité de polymériser pour former un anneau constitué de faisceaux de filaments au site de division de la cellule (152). Son activité GTPase et sa capacité à polymériser pourrait fournir la force nécessaire pour la constriction de la membrane (58, 75, 160, 182-184, 205, 273).

La quantité de FtsZ a été estimée entre 3000 et 15 000 molécules par cellule (147, 161, 200, 217). Dans la dernière hypothèse ceci permettrait la formation de 15-20 anneaux (161). La totalité des protéines ne sont cependant pas déployées au site de division puisque seulement 30% des protéines y sont présentes (237). Un échange constant s'effectue entre les protéines présentes dans le cytoplasme et celles polymérisées au niveau du site de division, ce qui fait de l'anneau Z une structure très dynamique (237). Cette dynamique très rapide implique d'ailleurs qu'un protofilament de FtsZ peut atteindre une longueur moyenne de 30 sous unités soit environ 0,1  $\mu\text{m}$  (163). Or, la circonférence du site de division est d'environ 3  $\mu\text{m}$  chez *E. coli*. Par conséquent, l'anneau FtsZ est constitué d'un assemblage de protofilaments de FtsZ

(25, 75). Ceci a été validé par tomographie en cryo-microscopie électronique chez *C. crescentus* (152).

### III.2 Mécanisme de constriction

Basés sur le fait qu'un anneau Z disjoint n'empêche pas la constriction de la membrane (2), deux modèles non exclusifs expliquant le mécanisme de constriction de l'anneau Z ont été proposés par Bramhill. Dans le premier, une protéine motrice permettrait le recouvrement progressif de protofilaments de FtsZ. Dans le deuxième, la constriction de l'anneau serait médiée par la perte progressive de molécules de FtsZ au niveau d'une jonction qu'il établirait avec une molécule d'ancrage à la membrane (24). Plus récemment, Li *et al.* ont proposé un modèle où un changement de conformation répété de courts filaments de FtsZ entraîne l'invagination progressive de la membrane (152).

### III.3 Facteurs influençant la polymérisation de FtsZ

L'équilibre entre assemblage et désassemblage est constant, et important pour la mise en place des polymères de FtsZ dans la cellule. Par conséquent, tous les facteurs, entre autres protéiques, qui influencent cette dynamique sont des acteurs importants qui dictent où et quand la division cellulaire a lieu.

Outre le système Min et l'occlusion par les nucléoïdes, d'autres protéines interagissant directement avec FtsZ ont été identifiées comme régulateur de l'assemblage de FtsZ dans la cellule. FtsA, ZipA, ZapA, et SepF sont connues pour interagir avec FtsZ et augmenter la stabilité de l'anneau FtsZ. D'autres facteurs déstabilisants comme MinC, SulA, EzrA et ClpX sont nécessaires au désassemblage de cet anneau Z.

#### III.3.1 FtsA

Tout comme FtsZ, FtsA est une protéine très conservée parmi les bactéries. Elle est essentielle chez *E. coli* (166), *C. crescentus* (218) et *S. pneumoniae* (147). De nombreuses mutations conditionnelles létales dans le gène *ftsA* d'*E. coli* provoquent l'absence de division à température non permissive. Chez *B. subtilis*, FtsA n'est pas une protéine essentielle mais elle est importante pour la division (8, 138). De part sa séquence et sa structure, FtsA est similaire à la superfamille des ATPases auxquelles appartiennent l'actine et Hsp70 (20, 253). Chez *S. pneumoniae*, il a été montré que FtsA, présente à 2200 copies/cellule, est capable de polymériser *in vitro* en forme de tire bouchon (147). Le ratio entre FtsA et FtsZ a été estimé

par la technique d'immunoblot à 1:5 chez *E. coli* et *B. subtilis* (80, 217). Ce ratio est important pour la viabilité d'*E. coli* (47). Chez le pneumocoque ce ratio est plus proche de 2:3. Mais, étant donné la distribution de ces molécules entre le cytoplasme et le site de division, leur stœchiométrie dans le divisome peut être différente de celle obtenue pour la cellule entière (76). FtsA possède une hélice amphiphatique conservée présente dans sa partie C-terminale qui lui sert d'ancrage à la membrane (197). La partie C-terminale permet à FtsA d'interagir avec elle-même et est importante pour sa localisation au site de division (271).

Chez *E. coli*, FtsA est nécessaire pour le recrutement au site de division de FtsK, FtsQ, FtsL, FtsI et FtsN (3, 41, 88, 260, 261). Fait intéressant, quand FtsQ est localisé artificiellement au site de division, FtsA n'est plus nécessaire au recrutement de ces protéines au site de division (92). Dans ce cas, bien que l'anneau FtsZ soit formé et les protéines « tardives » recrutées, les cellules du mutants *ftsA12(Ts)* ne sont pas capables de se diviser. FtsA a donc probablement un rôle propre, autre que le recrutement de partenaires. Chez *B. subtilis*, FtsA n'est pas absolument nécessaire au recrutement des protéines « tardives » de la division (111). FtsA a un rôle dans la formation et la stabilisation de l'anneau FtsZ. Sa dimérisation ou oligomérisation augmente sa capacité à promouvoir l'intégrité de l'anneau FtsZ (227). Chez *E. coli*, deux protéines semblent jouer ce rôle : ZipA et FtsA. Chacune est capable seule de remplir cette fonction (198). L'essentialité de ZipA, protéine présente seulement dans la sous-division  $\gamma$  des protéobactéries (170), peut être contournée par la simple présence d'une mutation ponctuelle dans FtsA (84). Une mutation qui se trouve au niveau d'un résidu conservé uniquement chez ces  $\gamma$ -protéobactéries.

FtsA dépend de FtsZ pour se localiser au septum (105) et il n'y a pas de décalage temporel dans leur localisation (65). FtsA interagit avec FtsZ (70, 167) et semble important pour cibler FtsZ à la membrane cytoplasmique (197). Cependant, l'ancrage à la membrane de FtsZ par l'hélice amphiphatique de FtsA peut être contourné (226). Chez *B. subtilis*, le complexe FtsA-FtsZ existe avant la formation de l'anneau FtsZ au site de division (138).

### III.3.2 ZipA

ZipA, comme FtsA est un stabilisateur de l'anneau FtsZ. Elle se localise à l'anneau FtsZ, via une interaction directe avec la partie C-terminale conservée de FtsZ. De plus, ZipA est nécessaire au recrutement de FtsK, FtsQ, FtsL et FtsN au septum naissant d'*E. coli* (106). Bien que ZipA soit essentielle chez *E. coli* (104), des anneaux stables de FtsZ peuvent se former en son absence (198). Son rôle de stabilisateur n'est donc pas essentiel dans des conditions optimales de croissance. ZipA possède une partie transmembranaire N-terminale et

un domaine C-terminal cytoplasmique suffisant pour interagir avec FtsZ et induire la formation de protofilaments *in vitro* (107, 154). ZipA est absente chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*.

### III.3.3 ZapA

Identifiée chez *B. subtilis*, ZapA est une protéine stabilisatrice du polymère FtsZ présente dans de nombreuses bactéries, entre autre chez *E. coli* et *S. pneumoniae* (100). Elle interagit avec FtsZ *in vitro* et est colocalisée avec FtsZ *in vivo*. L'absence de ZapA chez *B. subtilis* n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules. Cependant, ZapA devient essentielle quand le niveau de FtsZ est diminué dans les cellules. Comme ZipA, ZapA stabilise le polymère de FtsZ et induit la formation de protofilament *in vitro*. Le mécanisme moléculaire impliquant ZapA dans la stabilisation de protofilaments de FtsZ n'est pas précisément établi. Cependant, l'oligomérisation de ZapA, démontrée chez *Pseudomonas aeruginosa*, suggère un rôle de pontage des protofilaments au sein de l'anneau FtsZ (158).

### III.3.4 FtsE/X

Tout comme les autres gènes *fts*, le locus *ftsE* a été découvert lors d'études génétiques de mutants thermosensibles d'*E. coli* incapable de se diviser à haute température (210). L'effet des mutations thermosensibles est cependant restauré par la présence de haute concentration en sel dans le milieu de culture et le mutant *ftsE(Ts)* continue à former des constriction et à se diviser à 42°C formant de courts filaments. Pour ces raisons, son implication dans la division a été remise en question (240). Mais, les gènes de *ftsEX* sont essentiels en absence d'agents modulateurs de l'osmolarité (209). A température non permissive, les cellules *ftsE(Ts)* filamentent confirmant leur implication dans la division (63, 89, 209, 210, 221).

Le locus *ftsE* contient trois gènes en opéron *ftsY*, *ftsE* et *ftsX* localisés à 77 minutes sur le chromosome d'*E. coli* (89). FtsEX présente une similarité de séquence avec les transporteurs ABC. FtsE est le composant qui lie l'ATP et FtsX, le composant membranaire (221). FtsE est essentielle chez *S. pneumoniae* (231). Chez *E. coli*, le recrutement de FtsX au site de division dépend de la présence des protéines FtsZ, FtsA et ZipA, alors que les protéines FtsK, FtsQ, FtsL et PBP3/FtsI dépendent de FtsE/X fonctionnelles pour leur localisation (221). L'interaction de FtsX avec FtsA et FtsQ a été montrée par un système double hybride bactérien (139). FtsE interagit avec FtsZ (44). Il a été suggéré que le complexe permet à la cellule d'assembler l'anneau FtsZ dans des conditions de basse concentration en sels (209).

### III.3.5 SepF(YlmF)

SepF a été identifiée chez *B. subtilis* comme étant un partenaire de FtsZ (109, 135). Elle est conservée chez les bactéries à Gram positif, présente chez *S. pneumoniae* (77) et absente chez *E. coli*. L'absence de SepF affecte peu la division cellulaire, mais entraîne la formation de septa de morphologie anormale chez *B. subtilis* (109, 135). Elle est essentielle en absence de FtsA ou de EzrA (voir ci-dessous) (135). La combinaison de mutations dans SepF et EzrA conduit à un effet synthétique létal (109). Elle est capable d'interagir avec elle-même et avec FtsZ (109). Elle se localise au site de division et dépend pour cela de la présence de FtsZ (109).

### III.3.6 SulA

SulA est exprimée chez *E. coli* dans le cadre de la réponse SOS suite à un endommagement de l'ADN. Dans ce cas, la division est arrêtée jusqu'à réparation de l'ADN. Elle interagit avec FtsZ, inhibe la division en bloquant sa polymérisation. Elle est capable d'inhiber l'activité GTPase de FtsZ *in vitro* (45). Elle est rapidement recyclée, dégradée par la protéase Lon (voir la revue (111)). SulA est peu conservée et essentiellement trouvée dans des espèces proches d'*E. coli*. Elle est absente chez *S. pneumoniae*.

### III.3.7 EzrA

EzrA est un régulateur négatif de l'assemblage de l'anneau FtsZ, présent essentiellement dans les bactéries à Gram positif (148) dont *S. pneumoniae*. Elle a été identifiée durant un crible de suppresseurs extragéniques de mutants thermosensibles *ftsZ-gfp*. Dans un contexte génétique *ftsZ-gfp*, des mutations entraînant la perte de fonction de la protéine EzrA ont restauré la viabilité des cellules à haute température (148).

EzrA est une protéine associée à la membrane cytoplasmique localisée de façon diffuse dans toute la cellule. Elle se localise au site de division après la formation de l'anneau FtsZ (148). Plusieurs observations montrent qu'elle serait présente pour empêcher la formation de polymères FtsZ à des endroits inappropriés. Premièrement, EzrA interagit directement avec FtsZ *in vitro* pour inhiber sa polymérisation (103). Deuxièmement, l'absence d'EzrA entraîne la formation de multiples anneaux FtsZ dans la cellule, au site de division et aux pôles (148). Troisièmement, l'absence d'EzrA diminue la quantité de FtsZ nécessaire pour initier la formation de l'anneau (148). Enfin, la surexpression d'EzrA entrave l'assemblage de FtsZ *in vivo* (103). Pour que l'anneau puisse se former au site de division, l'effet inhibiteur d'EzrA doit être dominé. C'est peut être le cas grâce aux acteurs favorisant



la polymérisation de l'anneau. Enfin, bien qu'EzrA soit impliquée dans l'inhibition de la polymérisation de FtsZ *in vitro*, elle ne déstabilise pas des polymères de FtsZ pré-assemblés (103). Ceci suggère que l'anneau complet est résistant à l'action d'EzrA et explique qu'elle puisse être co-localisée avec l'anneau formé.

### III.3.8 ClpX

ClpX appartient au complexe ClpXP, connu pour être un composant majeur de la machinerie du contrôle de qualité des protéines (242). Chez *B. subtilis*, ClpX a été retrouvé dans le crible génétique de mutants suppresseurs du phénotype thermosensible *ftsZ-gfp* par une approche similaire à celle utilisée pour EzrA (voir ci-dessus). ClpX inhibe l'assemblage de FtsZ *in vitro* et sa surexpression dans les cellules entrave la formation de l'anneau FtsZ (264). C'est une protéine conservée qui interagit directement avec FtsZ chez *E. coli* (82). Elle est essentielle chez *S. pneumoniae* (211). Le mécanisme par lequel ClpX régule la polymérisation de FtsZ est mal connu.

## IV. Coordination du processus de séparation des chromosomes et de division cellulaire

Une fois le site de division positionné au milieu de la cellule, une bonne coordination entre la séparation des chromosomes et la constriction de la membrane est essentielle pour que les chromosomes dupliqués soient bien répartis dans chacune des cellules filles.

### IV.1 FtsK

FtsK est une protéine multi-fonctionnelle intervenant dans la ségrégation et la décaténation des chromosomes, la résolution de dimères (172), et la division cellulaire (134, 153). C'est une grande protéine de 1329 acides aminés bien conservée parmi les bactéries (170). Elle possède une région N-terminale contenant quatre segments transmembranaires, une région centrale et un grand domaine C-terminal cytoplasmique. Sur les 500 derniers résidus, FtsK de *S. pneumoniae* possède 45% d'identité de FtsK d'*E. coli*.

Son domaine N-terminal est nécessaire à sa localisation au site de division et pour son rôle dans la division cellulaire (10, 73, 274). FtsK nécessite FtsZ, FtsA et ZipA mais pas FtsI et FtsQ pour se localiser au site de division d'*E. coli* (261). La région centrale, une longue séquence riche en proline et glutamine, est également impliquée dans la division cellulaire (19). Il a été suggéré que cette région serait importante pour la stabilisation des interactions de FtsK avec les autres protéines de la division. Chez *E. coli*, la surexpression de FtsK conduit à

l'inhibition de la formation de l'anneau FtsZ et par conséquent, à l'inhibition de la division cellulaire (73). Fait intéressant, les défauts de division du mutant portant la mutation FtsK44, qui est localisée dans le domaine N-terminal, sont supprimés quand le gène *dacA* est déléte (10). Le gène *dacA* code pour PBP5, une D,D-carboxypeptidase qui clive le pentapeptide du PG (voir section B.V.1) et génère ainsi des tripeptides. Ceci suggère que FtsK est également impliquée dans la synthèse du PG pendant la division. L'effet de mutations dans la partie N-terminale de FtsK peut également être supprimé par la surexpression de FtsN (73) ou une haute concentration en sel (10). L'expression de *ftsA(R286W)* ou la surexpression de *ftsQ* permettent à la cellule de survivre et de se diviser en absence de FtsK. Cependant les cellules forment des chaînettes avec de multiples septa (85).

Son domaine C-terminal se compose de trois sous domaines,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La structure cristallographique des domaines  $\alpha$ - $\beta$  de FtsK de *Pseudomonas aeruginosa* a été résolue et révèle une organisation hexamérique en forme d'anneau de ces sous unités (172). Le domaine C-terminal est capable de transloquer de l'ADN double brin en utilisant de l'ATP, ce qui est conforme à l'idée que FtsK puisse être responsable du déplacement de l'ADN dans les cellules filles lors de la fermeture du septum (6). SpoIIIE, son homologue chez *B. subtilis*, possède cette activité de translocation d'ADN lors du processus de sporulation (224).

## V. Synthèse de la paroi septale et protéines associées

Dans la liste des acteurs de la division, les protéines FtsW, FtsI et FtsN n'ont pas encore été citées. Ces protéines sont toutes membranaires avec un large domaine extra-cytoplasmique. La seule dont on connaît assez précisément la fonction est FtsI/PBP3. Elle est nécessaire à la synthèse du PG septal. Les autres sont peut être impliquées dans la synthèse du PG mais leur fonction n'a jamais été établie de façon précise.

### V.1 La paroi bactérienne

La paroi cellulaire, présente dans la plupart des bactéries, maintient leur forme et leur intégrité membranaire en les protégeant de la pression osmotique interne. Elle doit également permettre l'échange contrôlé des molécules entre le milieu et l'intérieur de la cellule.

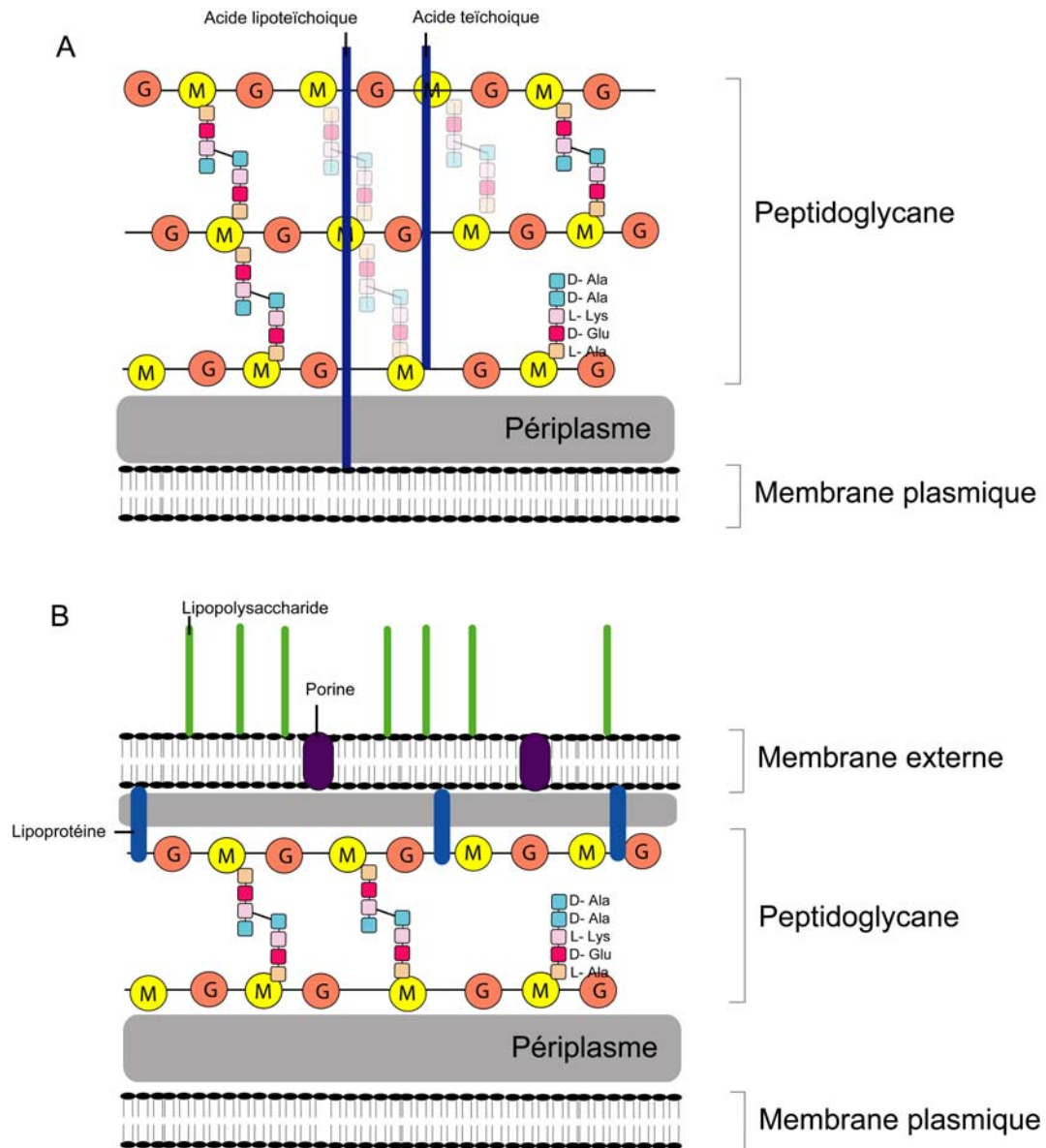


Figure 7. Représentation simplifiée de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. A. La paroi des bactéries à Gram positif est constituée de plusieurs couches de PG, d'acides teichoïques et lipoteichoïques. B. La paroi des bactéries à Gram négatif est composée d'une membrane externe reliée par des lipoprotéines à une mince couche de PG. La membrane externe contient des porines, qui permettent le passage de petites molécules hydrophiles à travers la membrane, et des lipopolysaccharides qui sont exposés à la surface des bactéries. Le PG situé dans l'espace périplasmique est constitué de chaînes de sucre (enchaînement d'unités dissaccharidiques *N*-acétyl-glucosamine (G) et acide *N*-acétyl-muramique (M)) pontées par des chaînes peptidiques. (D'après Cabeen *et al.*, 2005)

Il existe deux types de paroi, à Gram positif et à Gram négatif, dont la définition provient d'une technique de coloration mise au point en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est composée d'une épaisse couche de PG (de 20 à 80nm) et d'acides teichoïques et lipoteichoïques (Figure 7A). Les bactéries à Gram négatif possèdent, en plus, une membrane externe, contenant des porines et des lipopolysaccharides, qui recouvre une fine couche de PG (de 1 à 7 nm) et un espace

périplasmique (Figure 7B). Deux études ont montré par cryo-microscopie électronique l'existence d'un espace périplasmique entre la couche épaisse de PG et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif *B. subtilis* (174) et *S. aureus* (175), ceci malgré l'absence de membrane externe délimitant cet espace chez les bactéries à Gram négatif.

La force et la rigidité conférées par la paroi proviennent du PG. Le PG, ou muréine, est un maillage tridimensionnel poreux, organisé en une ou plusieurs couches, situé sur la face externe de la membrane cytoplasmique des bactéries. C'est un hétéropolymère constitué de l'assemblage de sucres et d'acides aminés. Les chaînes de sucres sont formées par l'enchaînement linéaire d'unités dissacharidiques *N*-acétyl-glucosamine (NAG) et acide *N*-acétyl-muramique (NAM) reliées par une liaison osidique  $\beta$ -1,4. Elles sont pontées entre elles par des chaînes peptidiques qui prennent naissance au niveau de la fonction carboxyle de l'acide D-lactique de NAM. La structure du PG doit être suffisamment dynamique pour permettre les variations morphologiques engendrées par la croissance et la division bactérienne. Pour cela, sa synthèse et sa dégradation doivent être finement régulées.

#### V.1.1 Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du PG débute dans le cytoplasme par la fabrication du précurseur du PG ou lipide II par les enzymes de la famille Mur. L'incorporation du lipide II, au PG préexistant est effectuée par des enzymes de la famille des PBPs pour « Penicillin Binding Proteins ». Les PBPs de haut poids moléculaire (HMW) de classe A sont bifonctionnelles. Elles possèdent une activité glycosyl-transférase (GT) permettant l'allongement des chaînes de sucre et une activité transpeptidase (TP) permettant de réticuler les chaînes de sucres entre elles. Les PBPs HMW de classe B sont monofonctionnelles. Elles possèdent un domaine N-terminal périplasmique de fonction inconnu et un domaine TP C-terminal. Les PBPs de bas poids moléculaires (LMW) ont une activité carboxypeptidase ou endopeptidase permettant la régulation du degré de réticulation du PG (96). Le nombre de ces enzymes ou PBPs varient d'une espèce à une autre. Beaucoup de bactéries ont de nombreuses PBPs, conduisant à une certaine redondance des fonctions de ces protéines (67, 203). Par exemple, les bactéries *E. coli* et *B. subtilis* possèdent respectivement 12 et 16 PBPs différentes. Chez les coques, qui ne possèdent pas de phase d'élongation, les PBPs sont moins nombreuses avec, respectivement chez *S. aureus* et *S. pneumoniae*, 4 et 6 PBPs.

Comme leur nom l'indique, les PBPs lient l'antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines comme la pénicilline par le biais d'une similitude structurale de l'antibiotique avec le

constituant D-Ala-D-Ala du pentapeptide du PG. Des changements dans l'affinité de ces enzymes de synthèse pour les  $\beta$ -lactamines entraînent la résistance des souches de pneumocoques à ces antibiotiques.

(i) FtsI: enzyme de synthèse du PG septal

FtsI est la seule PBP identifiée chez *E. coli* lors de l'étude des mutants thermosensibles filamenteux. Chez *E. coli*, deux membres des HMW PBPs de classe B semblent importants pour la synthèse spécialisée du PG. Des mutations dans le gène *mrda* (codant pour PBP2) conduisent à la formation de cellules sphériques, apparemment lié à l'arrêt de la synthèse de PG latéral (232). En revanche, des mutations dans le gène *ftsI* (codant pour PBP3 ou FtsI) abolissent la synthèse de PG septal mais pas la synthèse latérale ce qui entraîne la filamentation des cellules (202, 233). Dans le cas de FtsI, ceci corrobore également les résultats d'expériences utilisant des antibiotiques spécifiques de FtsI. En effet, l'addition d'aztreoname, piperacilline, furazlocilline, cephalothine ou cephalexine provoque l'arrêt de la division et par conséquent l'apparition de filaments (21, 34, 131, 192, 202). De façon intéressante, ces filaments ne sont pas lisses (comme pour le phénotype des mutants thermosensible FtsZ) mais présentent des débuts de septum avortés. Ces expériences suggèrent qu'il existe une enzyme de synthèse du PG septal non sensible à la pénicilline (PIPS) au tout début de la constriction de la membrane (187) mais cette enzyme n'a jamais été identifiée.

FtsI est une protéine membranaire bitopique constituée d'un domaine N-terminal cytoplasmique, d'un segment transmembranaire et d'un grand domaine périplasmique. La quantité de FtsI par cellule est estimée à environ 100 molécules par cellule (72). Le domaine C-terminal périplasmique est composé du domaine nPB (pour « non Penicillin Binding ») (200 résidus), dont la fonction n'est pas connue et le domaine C-terminal PB (« pour Penicillin Binding ») (300 résidus), qui contient les résidus catalytiques conservés caractéristiques des PBPs. Le domaine PB possède l'activité transpeptidase, impliquée dans la synthèse du PG au site de division (21, 234). La structure tridimensionnelle cristallographique du domaine extracellulaire de l'homologue PBP2x de *S. pneumoniae* a été résolue il y a plusieurs années (194). FtsI est recrutée tardivement au site de division (260, 266). Ses domaines transmembranaire et cytoplasmique sont importants pour sa fonction et sa localisation au site de division (49, 95, 102).

## (ii)FtsW

FtsW est une protéine essentielle à la division d'*E. coli*. Elle se localise au site de division (178, 208, 260) et possède 10 segments transmembranaires (86, 146). Elle appartient à la famille des protéines SEDS (« Shape, elongation division and sporulation ») impliquée dans la détermination de la forme, l'élongation, la division et la sporulation (120, 132). Les gènes codant pour les SEDS sont fréquemment organisés en opéron avec un gène codant pour une PBP de classe B. Chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis*, ce n'est pas le cas. Chez *E. coli*, le gène *ftsW* est proche de *ftsI* (22) et *rodA*, une autre SEDS, est juste à côté de *mrdA* (codant pour PBP2) (239). Le phénotype de délétion de *rodA* est similaire à celui de PBP2 (64, 243). Chez *B. subtilis*, le gène situé au même locus que *ftsW* s'appelle *spoVE* et est spécialisé dans la sporulation (119). Cependant un homologue de *ftsW* (*ylaO*) existe ailleurs sur le chromosome de *B. subtilis* (76).

Selon une étude des génomes séquencés (170), il y a une parfaite corrélation entre la présence et absence de FtsW et PBP3/FtsI, ceci suggérant que leur fonction est peut être reliée. La fonction la mieux établie pour les protéines SEDS est de recruter leur PBP associée. C'est le cas, par exemple, pour FtsW qui est nécessaire à la localisation de PBP3/FtsI au septum d'*E. coli* (178). FtsW est d'ailleurs essentielle à la division cellulaire d'*E. coli* (22). En outre, les protéines SEDS ont été proposées comme étant responsables de la translocation de précurseur lipide II de synthèse du PG de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane cytoplasmique et de le livrer au complexe de synthèse du PG (124). Ce rôle est compatible avec sa topologie multi-transmembranaire, mais n'a jamais été clairement démontré. Les PBPs de classe B n'ont pas de fonction transglycosylase et ne pourraient donc pas être les accepteurs du précurseur. Une protéine possédant l'activité GT doit être présente. Chez *E. coli*, FtsW interagit avec la PBP de classe A PBP1b et la GT monofonctionnelle, MgtA (68). Pourquoi existe-t-il deux SEDS, FtsW et RodA, chez *E. coli* ? Reconnaisent-elles des substrats différents ? Il existe quelques indices chez *E. coli* montrant que PBP2 préfère les chaînes latérales pentapeptidiques alors que PBP3/FtsI préfère les tripeptides (13). Il a été proposé que RodA et FtsW auraient des affinités différentes pour ces précurseurs et qu'ils transloqueraient le précurseur approprié aux différentes machineries du PG contenant leur PBP de classe B adéquate (124). Cependant, cette fonction n'a jamais été clairement établie et reste hypothétique.

Un rôle de FtsW dans la stabilisation de l'anneau FtsZ pendant la division cellulaire a également été suggéré (22). Une interaction entre FtsW et FtsZ a été identifiée chez *Mycobacterium tuberculosis* mais elle est médiée par une extension C-terminale de FtsW

absente dans beaucoup d'autres bactéries (56). Par ailleurs, il existe un complexe ternaire entre FtsW, FtsZ et PBP3 chez *M. tuberculosis* (57). Au moins pour le genre *Mycobacterium*, il se pourrait que FtsW soit important pour la coordination de la constriction de la membrane avec la synthèse du PG septal.

### (iii) FtsN

Le gène *ftsN* a été identifié comme étant un suppresseur multi copie d'une mutation thermosensible présente dans le gène *ftsA12(Ts)* (48). FtsN est une protéine peu conservée, absente chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* mais essentielle à la division d'*E. coli*. En effet, sa déplétion chez *E. coli* entraîne l'apparition de long filament (48). Sa localisation au site de division d'*E. coli* dépend de la localisation de FtsZ et FtsA, et de la fonction de FtsI et FtsQ (3). FtsA interagit avec FtsN indépendamment de FtsZ (43). FtsN ne se localise pas au septum en absence de FtsA même si FtsQ, FtsL, FtsB et FtsI sont correctement localisées au site de division (92). De plus, la surexpression de FtsN supprime plus ou moins l'effet de mutations thermosensibles dans les gènes *ftsQ1*, *ftsI23* et *ftsK44* (48, 73) et peut restaurer la viabilité d'une souche délétée de FtsK (94). Elle semble donc, au moins chez *E. coli*, fortement impliquée dans le divisome. C'est une protéine bitopique possédant un domaine N-terminal (comprenant un domaine cytoplasmique et un segment transmembranaire) et un domaine C-terminal périplasmique présente à environ 1000 copies par cellule (1). Son domaine N-terminal non essentiel dans l'assemblage du divisome est important pour compenser l'absence de FtsK (94). Son domaine C-terminal semble suffisant pour sa fonction dans la division cellulaire (49). La structure RMN de la partie C-terminal (résidus 243-319) du domaine périplasmique a été résolue et montre un repliement de type RNP (pour protéine liant les ARN), présent dans des protéines de fonctions multiples (270). Cependant, ce domaine présente une bonne similarité de séquence (29% d'identité) avec le domaine de liaison du PG d'une amidase de *B. subtilis*, CwlC (270). Par ailleurs, le domaine C-terminal se lie au PG *in vitro* et *in vivo* (251). Bizarrement, ce domaine C-terminal (résidus 243-319) n'est pas essentiel pour la division cellulaire dans des conditions de laboratoire (251). FtsN interagit avec PBP3 et PBP1b et stimule l'activité de synthèse du PG *in vitro* de PBP1b (185). C'est la première indication d'une régulation d'un complexe de synthèse du PG par une protéine du divisome.

### V.1.2 Clivage du peptidoglycane et séparation des cellules filles

Le clivage du PG est nécessaire à la séparation des deux cellules filles. Il est réalisé par des hydrolases spécifiques des liaisons du PG. Il en existe de nombreuses (voir la revue 257). Chez la plupart des bactéries à Gram positif, le septum est formé, puis clivé. En revanche, chez la plupart des espèces à Gram négatif, le clivage du septum se fait simultanément à la formation du septum, conduisant à une constriction de forme typique en V plutôt qu'à une septation (Figure 5). Il existe de nombreux exemples de mutants déficients pour une ou plusieurs hydrolases et qui ont des défauts dans la séparation des cellules. Par exemple, le mutant nul *atl* chez le coque *S. aureus* forme des groupes de cellules non séparées (238). Un mutant *lytB* de *S. pneumoniae* forme de longues chaînes de cellules qui peuvent être séparées par l'ajout de LytB dans le milieu de culture (62, 83). Atl et LytB se localisent au site de division.

De multiples hydrolases clivent le septum pendant la division cellulaire d'*E. coli*. Les cellules du mutant de délétion *amiC* se séparent de façon imparfaite pendant la division. 20 à 30 % des cellules forment des chaînettes de 3 à 6 cellules non séparées. AmiC se localise au site de division des cellules en constriction (16). L'inactivation du gène *amiA* entraîne la formation de chaînette de 3 ou 4 cellules pour seulement 5 à 10 % de la population. La délétion du gène codant pour la troisième amidase d'*E. coli*, *amiB* n'entraîne pas la formation de chaînettes. En revanche, la délétion des 3 gènes codant pour les amidases AmiA, AmiB et AmiC, ou des 6 gènes codant pour les transglycosylases lytiques Slt70, MltA, MltB, MltC, MltD et EmtA, entraîne la formation de chaînette contenant jusqu'à 20 cellules par chaîne (117, 118). Les endopeptidases PBP4, PBP7 et MepA contribuent également au clivage du septum. Si les délétions des amidases sont combinées aux délétions des transglycosylases lytiques ou endopeptidases, les chaînes deviennent très longues et peuvent contenir une centaine de cellules (257).

Il est possible qu'il existe d'autres gènes important pour le processus de division cellulaire qui n'ont pas encore été découvert. La découverte de plusieurs d'entre eux a été facilité par l'analyse d'une grande collection de mutants thermosensibles chez *E. coli* et *B. subtilis*. Les autres ont été identifiés par différentes approches : biochimique, bioinformatique, génétique ou par chance. Par conséquent, toutes les discussions et modèles présentés ici doivent être tempérés puisque des éléments de la division restent peut être à identifier et que beaucoup des protéines participant au processus n'ont pas encore de fonctions précises.



## VI. Modèle d'assemblage du divisome

### VI.1 Localisations et dépendances dans le recrutement au septum

La division cellulaire nécessite le recrutement au site de division de toutes les protéines conservées. Des travaux basés sur des techniques de microscopie à fluorescence couplées à de la génétique ont permis d'établir un modèle de dépendance de recrutement, qui est quasiment linéaire chez *E. coli* (FtsZ<FtsA/ZipA<FtsE/FtsX<FtsK<FtsQ<FtsL/FtsB<FtsW<FtsI<FtsN) (32, 209). L'absence d'une protéine entraîne l'absence au site de division de toutes les protéines en aval de ce schéma d'interdépendance (Tableau 2 et Figure 8A). Chez *B. subtilis*, ce schéma de dépendance est plus complexe pour les protéines testées (Tableau 3 et Figure 8B). Chez *E. coli*, la localisation de FtsQ en absence de FtsA et FtsK, normalement nécessaire à son recrutement a été accomplie en fusionnant FtsQ à ZapA (92). FtsQ-ZapA est capable de recruter FtsK au site de division, en absence de FtsA, ceci suggérant une interaction *in vivo* entre FtsQ et FtsK. Le complexe FtsQ FtsL et FtsB existe *in vivo* en absence de FtsK (32). Par conséquent, FtsK n'est pas essentielle pour la formation du complexe ternaire FtsQ FtsL FtsB mais probablement pour son recrutement au site de division. FtsQ-ZapA est capable de recruter FtsI et ne nécessite pas la présence de FtsA et FtsK au site de division.

Tableau 2. Dépendance des protéines de la division pour leur localisation au site de division d'*E. coli*.

Protéines	Référence pour les travaux de localisation au site de division	Références des travaux concernant la dépendance de localisation pour <sup>a</sup> :										
		FtsZ	FtsA	ZipA	FtsX	FtsK	FtsQ	FtsL	FtsB	FtsW	PBP3	FtsN
FtsZ	(18, 167)		(2, 4, 105)	(105, 154)		(39, 261, 274)	(2)	(88)		(22, 178)	(2, 202, 260, 265)	(3, 39)
FtsA	(4, 167)	(4, 105, 168)		(105, 154)	(221)	(39, 261, 274)	(4)	(88)		(178)	(4, 260, 265)	(39)
ZipA	(104, 154)	(105, 154, 168)	(105, 154)		(221)	(39, 261)	(41)	(88)		(178)	(154, 265)	(39)
FtsX	(221)	(221)	(221)	(221)		(221)	(221)	(221)			(221)	
FtsK	(39, 261, 274)	(261, 274)	(261, 274)	(106, 198)	(221)		(261)				(260, 261, 274)	
FtsQ	(30, 41)	(41)	(41)	(106)	(221)	(39)		(33, 41)	(33)	(178)	(41)	(39)
FtsL	(88)	(88)	(88)	(106)	(221)	(39)	(88)		(33)	(178)	(88)	(39)
FtsB	(33)						(33)	(33)		(33)	(33)	
FtsW	(178, 260)						(178)	(178)	(33)		(178)	
PBP3	(260, 265, 266)	(260, 265)	(260, 265)	(106)	(221)	(39)	(265)	(265)	(33)	(178)		(39)
FtsN	(3)	(3)	(3)	(106)			(3)				(3, 260)	

<sup>a</sup>Les références signalées en rouge indiquent que la localisation est indépendante de la protéine nommée en haut de la colonne ; En revanche, les références en noire indiquent que la localisation est dépendante de la protéine nommée en haut de la colonne. (D'après Errington, 2003)

Tableau 3. Dépendance des protéines de la division pour leur localisation site de division de *B. subtilis*.

Protéines	Référence pour les travaux de localisation au site de division	Références des travaux concernant la dépendance localisation pour <sup>a</sup> :				
		FtsZ	DivIB	FtsL	DivIC	PBP2B
FtsZ	(150, 263)		(143)	(53)		(52)
FtsA	(80)	(80)	(80)			
DivIB	(116)	(143)		(53)	(143)	(52)
FtsL	(51, 230)	(51)	(51)		(51)	(51)
DivIC	(141)	(143)	(143)	(53)		(52)
FtsW	(208)					
PBP2B	(52)	(52)	(52)	(52)	(52)	
SepF	(109)	(109)				

<sup>a</sup> Les références signalées en rouge indiquent que la présence au site de division est indépendante de la protéine nommée en haut de la colonne ; En revanche, les références en noire indiquent que la présence au site de division est dépendante de la protéine nommée en haut de la colonne. (D'après Errington, 2003)

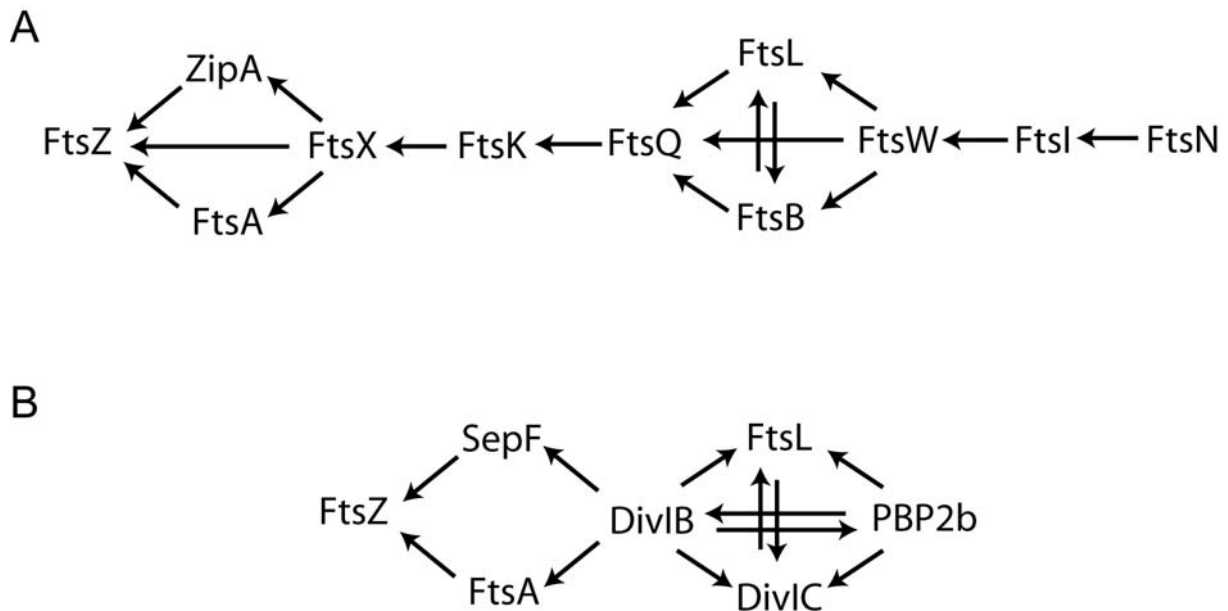


Figure 8. Le processus de recrutement au site de division d'*E. coli* et *B. subtilis*. A) Le processus de recrutement chez *E. coli* est essentiellement linéaire. La formation de l'anneau FtsZ nécessite soit ZipA soit FtsA, et ces deux protéines sont nécessaires au recrutement des protéines tardives dans l'assemblage du divisome. B) Le processus de recrutement au septum des protéines de la division de *B. subtilis* se fait en deux étapes. Premièrement, l'anneau FtsZ s'assemble et il est stabilisé soit par FtsA soit par SepF. Deuxièmement, DivIB, FtsL, DivIC et PBP2B se localisent de façon interdépendante et forme le divisome. (D'après Harry, 2006)

## VI.2 Interactions entre les différentes protéines du « divisome »

Le schéma d'interdépendance de toutes les protéines de la division pour leur localisation au septum suggérait des interactions entre ces protéines. L'utilisation de systèmes doubles hybrides bactériens a permis d'établir une carte d'interactions des protéines de la division d'*E. coli* (Figure 9).

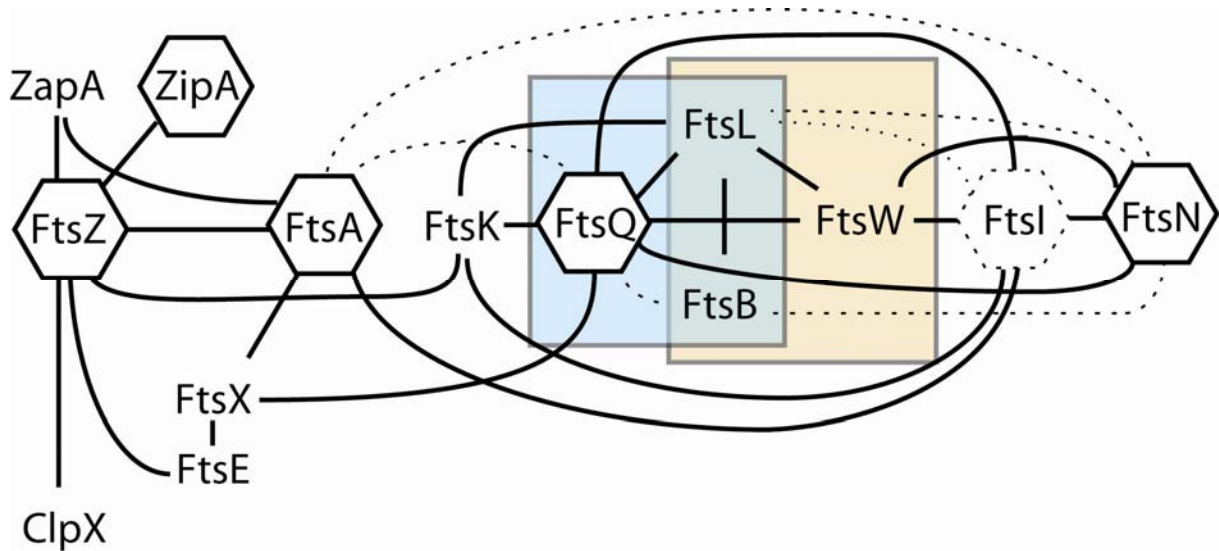


Figure 9. Carte d'interaction des protéines de la division chez *E. coli*. En pointillées sont représentées les interactions détectées par un seul des deux systèmes double hybride (70, 139), ou détectées dans une configuration de double hybride (Bait-X Target-Y) et non avec l'autre configuration (Target-X Bait-Y). FtsK et ZipA n'ont pas été testées par Karimova *et al.* FtsB et FtsX n'ont pas été testées par Di Lallo *et al.* Les carrés montrent les complexes ternaires FtsQ FtsL FtsB et FtsL FtsB FtsW. Les polygones représentent une interaction d'une protéine avec elle-même. ClpX, ZapA et FtsE ne sont pas intégrés dans les tests doubles hybrides.

Le système double hybride bactérien de Karimova *et al.*, nommé BACTH, est basé sur le principe suivant (140): L'interaction des protéines testées entraîne la reconstruction du domaine catalytique de l'adenylate cyclase (T25 et T18), conduisant à la synthèse d'AMPc et à l'activation du gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase dans une souche d'*E. coli* déficiente en adenylate cyclase endogène. Ainsi, les protéines n'ont pas besoin d'être proche de la machinerie de transcription puisque l'AMPc diffuse dans la cellule. Le système BACTH est donc particulièrement bien adapté pour les protéines membranaires (Figure 10a). Le système double hybride bactérien de Di Lallo *et al.* repose sur la reconstitution d'un répresseur chimérique P22 et 434. Quand les protéines testées fusionnées au domaine P22 et 434 interagissent, le répresseur reconstitué reconnaît l'opérateur chimérique présent dans le chromosome de la souche *E. coli* R721 et le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase est réprimé (69) (Figure 10b).

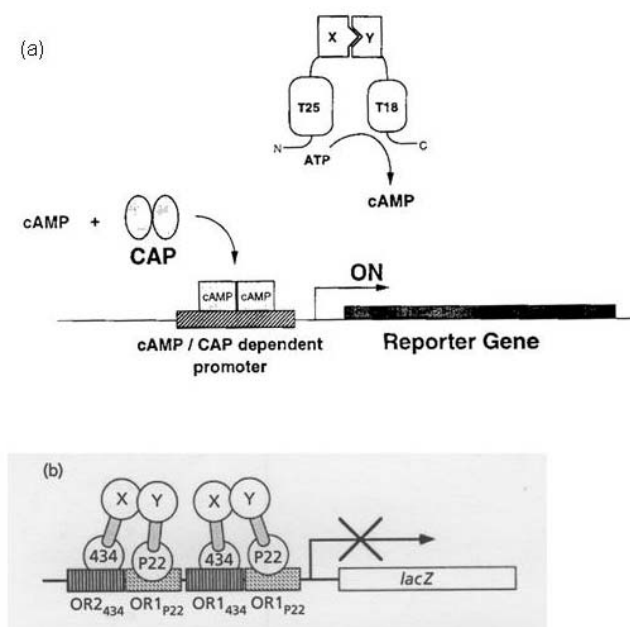


Figure 10. Principe des systèmes deux hybrides bactériens utilisés pour dresser la carte d'interactions des protéines impliquées dans la division. a) Système deux hybride bactérien BACTH (140). Les protéines X et Y sont fusionnées aux deux domaines catalytiques T25 et T18 de l'adenylate cyclase. L'interaction de X et Y conduit à la synthèse d'AMPc et à l'expression du gène rapporteur dans les cellules *E. coli cya*. b) Système deux hybride bactérien de Di Lallo *et al.* Quand les deux protéines fusionnées X et Y interagissent, le répresseur chimérique formé de P22 et 434 reconnaît la séquence opératrice et réprime la synthèse du gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase chez *E. coli*.

Parmi toutes les interactions testées la dimérisation de FtsA, FtsZ, l'interaction de FtsE avec FtsX et l'interaction de FtsZ avec FtsA, FtsE, ZipA, ZapA et ClpX ont été démontrées par différentes approches (37, 44, 63, 82, 104, 158, 181, 262, 271 ). L'utilisation des systèmes double hybride a confirmé certaines de ces interactions et apporté de nouvelles données montrées dans la Figure 9.

FtsA interagit avec FtsI (70, 139). Cette interaction avait été suggérée dans la publication de Tormo *et al.* (246), puis confortée par de récentes données (43). FtsA interagit également avec FtsX (139). FtsN est connu pour être un suppresseur multi copie du mutant *ftsA12(Ts)* (48), bien que n'ayant pas été identifié par Di lallo *et al.*, Karimova *et al.* montrent une interaction entre ces deux protéines. Les deux équipes s'accordent à montrer que FtsN interagit avec FtsQ, FtsI et FtsW (70, 139). FtsQ interagit avec pratiquement toutes les protéines de la division (FtsA, FtsX, FtsK, FtsN, FtsL et FtsB, FtsW, FtsI), et semble par conséquent une protéine centrale pour la formation du « divisome ». D'ailleurs, des données de génétiques suggéraient déjà un lien entre certains de ces gènes. La surexpression de FtsQ induit la filamentation à température permissive des mutants thermosensibles *ftsA* et *ftsI* (47). La surexpression de FtsN supprime partiellement le phénotype du mutant *FtsQ1(Ts)* (48). L'interaction entre FtsI et FtsW confirme certaines suggestions (70, 139, 178). FtsL interagit avec FtsW, FtsQ et FtsB (70, 139, 230). L'interaction de FtsL avec les protéines FtsI et FtsN n'a été détectée qu'avec le système double hybride de Karimova *et al.* Pour FtsN, le niveau d'interaction détecté est faible.

De nombreuses protéines (FtsZ, ZipA, FtsA, FtsQ, FtsI et FtsN) sont capables d'interagir avec elle-même (70, 139). Pour FtsI, l'équipe de Karimova *et al.*, ne détecte qu'un faible signal d'interaction. Di Lallo *et al.*, montre que FtsK (résidus 1 à 724) peut interagir avec FtsZ, FtsQ, FtsL et FtsI.

Les interactions entre les protéines de la division, déduites de deux cribles indépendants de type double hybride, sont complexes. Des protéines recrutées tôt au site de division, comme FtsA, peuvent interagir avec des protéines nécessitant la localisation de toutes les autres protéines, comme FtsI et FtsN. Ceci indique que le recrutement séquentiel de ces protéines au site de division d'*E. coli* ne s'explique pas par un modèle d'interaction des protéines deux à deux. Il se peut que la surexpression des protéines fusionnées révèle des interactions de faible affinité. Ces interactions ne seraient pas assez fortes et donc stables *in vivo* pour permettre, par exemple, le recrutement au site division de FtsN par FtsA. Cependant, le fait que beaucoup de protéines Fts établissent de multiples interactions, même faible avec d'autres protéines de la division, suggèrent un modèle d'assemblage au septum de type coopératif. L'expérience de triple hybride réalisée par Karimova *et al.* démontre l'existence des complexes ternaires FtsQ FtsL FtsB et FtsW FtsL FtsB dans les membranes d'*E. coli* (139). L'étude détaillée du complexe ternaire FtsQ/DivIB, FtsL et FtsB/DivIC est au cœur du travail de thèse présenté dans ce manuscrit.

Aarsman *et al.* ont démontré qu'il existe au moins deux étapes de maturation du site de division d'*E. coli* (1). La première étape consiste en la mise en place de l'anneau FtsZ et de ses partenaires FtsA, ZipA et ZapA. Après un délai de 17 minutes (sur 85 minutes de temps de génération) les protéines FtsQ, FtsW, FtsI et FtsN se localisent. En ce qui concerne FtsK et FtsE/X, leur moment de recrutement n'a pas encore été établi.

Grâce aux données d'interactions, de dépendances mutuelle pour leur recrutement au septum et à la dimension temporelle apportée par Aarsman *et al.*, un modèle d'assemblage du divisome peut être envisagé (Figure 11).

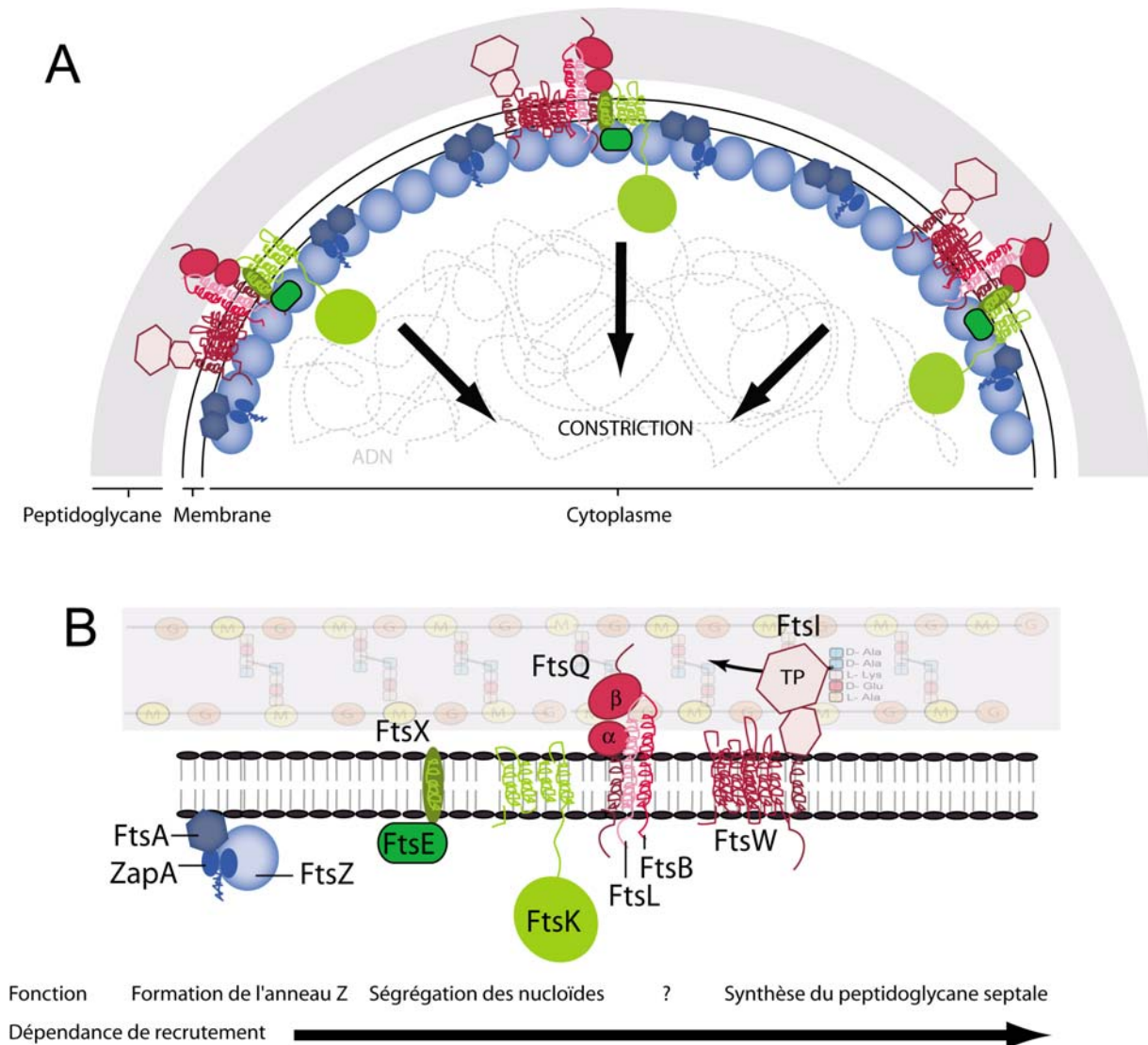


Figure 11. Modèle d'assemblage des protéines conservées du divisome. A. Coupe transversale d'une bactérie en division. Les protéines colorées en bleu se localisent au site de division pour former et stabiliser l'anneau Z. Puis les protéines colorées en rouge sont recrutées à l'anneau de division. Le moment de recrutement des protéines représentées en vert (FtsK, FtsE et FtsX) n'est pas connu. Les interactions entre les protéines sont respectées dans la mesure du possible B. La représentation intègre les données de dépendance et de moment de recrutement et la fonction. Le nom des protéines est indiqué.

## DIVIB, DIVIC ET FTSL : UN COMPLEXE CENTRAL DE LA DIVISION

Dans le schéma d'interdépendance des protéines pour leur localisation septale, les trois protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL sont centrales. Elles dépendent de la localisation au septum de protéines importantes pour la constriction de la membrane et de la ségrégation des nucléoïdes et sont nécessaires à la localisation de protéines impliquées entre autre dans la synthèse de la paroi. Or, nous avons insisté sur la nécessité de coordination de tous ces processus de façon spatio-temporelle afin de garantir une division bactérienne correcte. L'étude de la fonction de ces trois protéines s'avère donc essentielle à la compréhension de la division bactérienne.

### I. Les acteurs : DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL

DivIB et FtsQ sont des homologues respectivement chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, de même DivIC et FtsB. La double nomenclature (DivIB/FtsQ, etc...) sera utilisée lors de commentaires généraux s'appliquant à ces protéines. La nomenclature spécifique (DivIB par exemple) sera utilisée lors de commentaires sur les espèces particulières.

#### I.1 Découverte

Tout comme beaucoup d'autres gènes impliqués dans la division bactérienne, *divIB/ftsQ*, *divIC/ftsB* et *ftsL* ont été découverts lors d'étude de mutants *fts*, qui filamentent à température non permmissible, chez *E. coli* et/ou chez *B. subtilis* (12, 27, 136, 177, 191). Des études bio-informatique et d'analyse des opérons ont permis par la suite d'identifier les gènes de *ftsL* chez *B. subtilis* (55) et *S. pneumoniae* (173), et les orthologues de *divIC* chez *E. coli* (33) et chez *S. pneumoniae* (190).

Les gènes de *divIB/ftsQ* et *ftsL* se trouvent dans un groupe de gènes impliqués dans la synthèse de la paroi et la division cellulaire (*dcw* pour « division and cell wall »), à 133-135° sur le chromosome de *B. subtilis* (55, 115), à 2 minutes chez *E. coli* (12, 136, 180), dans le groupe 2 et 3 du *dcw*, respectivement, chez *S. pneumoniae* (173). Il existe une différence notable en termes de position des gènes entre *divIB* de *B. subtilis* et *ftsQ* d'*E. coli*. Un fragment additionnel de 2 kb contenant les gènes *ylxW*, *ylxX*, et *sbp* se trouve entre *divIB* et *ftsA* chez *B. subtilis*. Par conséquent, *divIB* de *B. subtilis* est en opéron avec plusieurs gènes de la synthèse de la paroi (principalement des gènes *mur*) et non avec *ftsA* comme chez *E. coli*. Chez *S. pneumoniae*, tout comme chez *B. subtilis*, *divIB* est localisé au sein d'un groupe de gènes *mur* dans le groupe 2 du *dcw*, et non dans le groupe 1 de gènes contenant *ftsA* et *ftsZ*.

(173). Cependant cette organisation des gènes n'est pas reliée au fait que *B. subtilis* et *S. pneumoniae* sont des bactéries à Gram positif. En effet, chez les bactéries à Gram positif, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis*, *divIB* est localisé en amont de *ftsA* et *ftsZ* (204).

Le gène *divIC* ne se trouve pas dans le groupe de gènes *dcw* impliqués dans la synthèse de la paroi et la division cellulaire. Chez *E. coli*, les gènes en aval de *ygbQ*, qui sont *ygbP* et *ygbB*, sont connus pour être impliqués dans le processus de biosynthèse des isoprénoïdes (33). Chez *S. pneumoniae*, le gène *divIC* se trouve juste avant un gène (locus spr0009) codant pour une protéine non caractérisée de la famille ASPRE (« Active site serine penicillin-recognizing enzyme ») qui inclut les  $\beta$ -lactamases de classe A et C ainsi que les PBPs.

Les gènes *divIB/ftsQ*, *ftsL* et dans une moindre mesure *divIC/ftsB* sont présents à proximité de gènes impliqués dans la division cellulaire et la synthèse de la paroi.

## I.2 Topologie et abondance

Les gènes *divIB/ftsQ*, *divIC/ftsB* et *ftsL* codent pour des protéines de topologie identique. Ce sont des protéines membranaires bitopiques, possédant une partie N-terminale cytoplasmique, une région transmembranaire et un domaine extra-cytoplasmique C-terminal (Figure 12) (38, 101, 114, 141).

### I.2.1 FtsL

FtsL est une petite protéine d'une centaine d'acides aminés (Figure 12), peu abondante, présente entre 20 et 40 copies par cellules chez *E. coli* (101). Chez *B. subtilis*, malgré une identité de séquences non significative (16% avec la protéine d'*E. coli*), la protéine est prédite pour être homologue à FtsL d'*E. coli* sur la base de sa taille (117 résidus), de sa topologie membranaire, du phénotype résultant de son absence et de sa localisation juste avant le gène *pbpB* (53, 55). Elle possède dans la partie N-terminale de son domaine extra-cytoplasmique, 5 leucines séparées les unes des autres par 7 résidus, caractéristique des domaines coil-coiled leucine zippers. Ces domaines sont des hélices  $\alpha$  qui s'associent longitudinalement en dimère ou trimère et forment une super hélice. Ils sont impliqués dans des processus d'homo- ou d'hétéro-dimérisation des protéines (162). Il a d'ailleurs été démontré que le domaine périplasmique de FtsL peut induire la formation de multimères *in vitro* résistant au sodium dodecyl sulfate (SDS) (87).



### I.2.2 DivIC/FtsB

DivIC est petite protéine d'une centaine d'acides aminés (Figure 12), qui possède également un domaine coil-coiled dans sa partie extra-cytoplasmique (33, 149). Les protéines DivIC de *B. subtilis* et FtsB d'*E. coli* ont une identité de séquence non significative (14%) mais sont prédites homologues sur la base de leur taille, de la présence du domaine coiled-coil, de leur localisation au site de division, et de leur phénotype de délétion (33). Chez *B. subtilis*, DivIC est une protéine très abondante, présente à environ 50000 molécules par cellules (141).

### I.2.3 DivIB/FtsQ

DivIB est une protéine plus grande dont la taille varie selon les espèces de 194 acides aminés (*Thermus thermophilus*) à 439 acides aminés (*S. aureus*). DivIB de *B. subtilis* et FtsQ d'*E. coli* ont une identité de séquence de 18% (113) mais sont dites homologues sur la base de leur taille, de leur topologie, de la localisation des gènes dans le génome. De plus, une souche d'*E. coli* dépletée en FtsQ peut être partiellement complétée par l'expression de DivIB de *S. pneumoniae* (46).

La traduction de FtsQ et son insertion dans la membrane sont des événements couplés (252) médiés par la particule de reconnaissance du signal (SRP) et fait intervenir les composants de translocation SecY, SecA et YidC (223, 245, 250, 252).

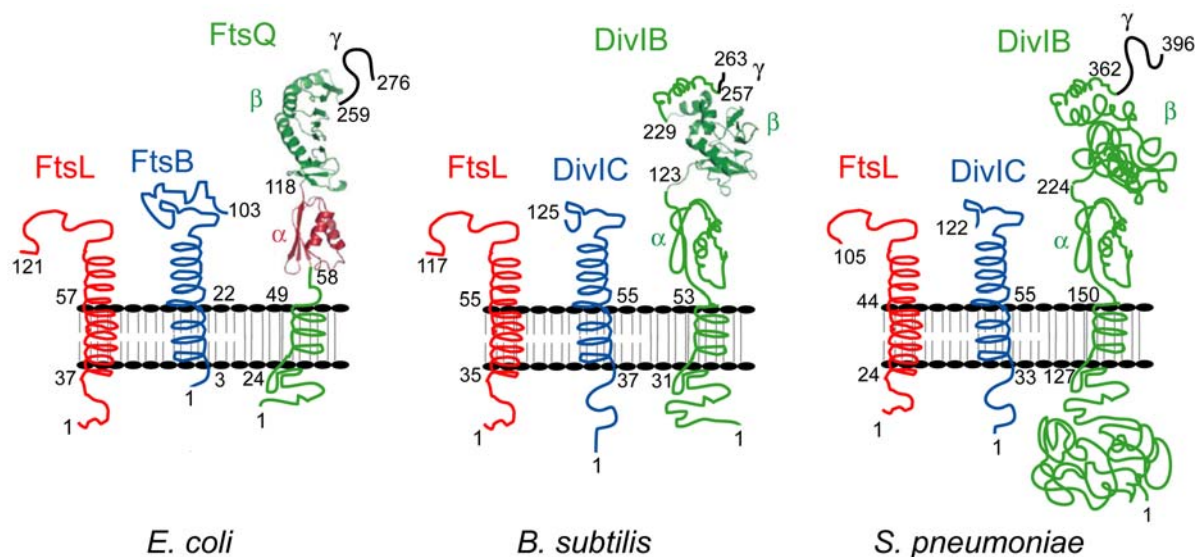


Figure 12. Topologie des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL chez *E. coli*, *B. subtilis* et *S. pneumoniae*.

Robson *et al.* ont proposé sur la base d'expérience de protéolyse que la partie extracellulaire de DivIB de *Geobacillus stearothermophilus* est organisée en trois domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (212). Récemment, la structure du domaine périplasmique de FtsQ d'*E. coli* et *Yersinia*

*enterocolitica* a révélé que les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  sont structurés (Figure 13) (254). Le domaine  $\alpha$  proche de la membrane cytoplasmique est similaire au domaine POTRA (212, 219). Ce domaine est présent dans des protéines impliquées dans le transport ou l'assemblage de polypeptides non repliés et possède une fonction de type chaperonne. La structure du domaine  $\beta$  est unique constitué de 9 brins  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$  (212, 254) (Figure 13). Des expériences de protéolyse du domaine extracellulaire de DivIB de *G. stearothermophilus* ont montré un domaine  $\beta$  plus court (allant jusqu'à l'acide aminé 230 de DivIB de *G. stearothermophilus*) (Figure 25A). La coupure enzymatique a lieu dans une boucle entre l'hélice  $\alpha$  H5 et le brin  $\beta$  S11 entraînant la disparition dans la structure RMN des deux brins  $\beta$  S11 et S12 trouvés chez FtsQ d'*E. coli* (Figure 13 et 25). Le domaine  $\gamma$ , correspondant aux 15 résidus C-terminaux pour FtsQ d'*E. coli* (Figure 25A), est non structuré et pas important pour la fonction de FtsQ (93, 254). Un glutamate est très conservé dans la séquence de DivIB/FtsQ de nombreuses espèces. Il s'agit du glutamate en position 125 chez *E. coli*. Le mutant thermosensible *ftsQ1(Ts)* possède une seule mutation, E125K.

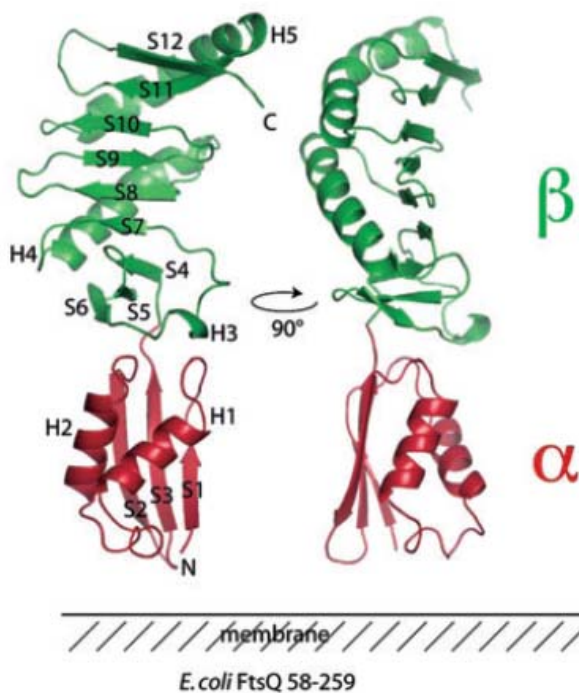


Figure 13. Représentation en ruban de la structure cristallographique du domaine périplasmique de FtsQ d'*E. coli* (résidus 58-260). Les structures secondaires sont numérotées selon leur ordre d'apparence dans la séquence primaire. D'après van den Ent *et al.*, 2008

FtsQ est une protéine peu abondante chez *E. coli*, présente à environ 50 molécules par cellule (38), alors que chez *B. subtilis*, son orthologue DivIB, est cent fois plus abondante, présente à environ 5000 molécules par cellule (216).

En conclusion, DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL ont une topologie similaire, bitopique membranaire, avec un domaine N-terminal cytoplasmique. Bizarrement bien qu'elles soient conservées dans de nombreuses espèces, elles ont une identité de séquence non significative d'une espèce à une autre. Les expériences de quantification montrent que FtsQ et FtsL sont présentes en quantité équivalente chez *E. coli*. DivIC semble dix fois plus abondante que DivIB chez *B. subtilis*. Enfin DivIB est cent fois plus abondante chez *B. subtilis* que chez *E. coli*. Il a été suggéré que cette différence d'abondance correspond à la nécessité de fabriquer une paroi plus épaisse chez les bactéries à Gram positif.

## II. Les rôles cellulaires de DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL

L'étude des mutants thermosensibles filamenteux chez *E. coli* et *B. subtilis* a permis d'identifier les trois gènes *divIB*, *divIC* et *ftsL*. L'étude du phénotype des bactéries possédant des mutations, des délétions ou des régulations négatives ou positives de ces gènes renseigne donc potentiellement sur leur fonction cellulaire.

### II.1 Etude du phénotype des mutants : rôle dans la division cellulaire.

#### II.1.1 Phénotype des mutants thermosensibles filamenteux

##### (i) FtsL

Deux mutants thermosensibles pour le gène *ftsL* ont été isolés chez *E. coli* : *mraR33* et *mraR36* (136). Le premier conduit à la production d'une protéine mutée E88K, entraînant la lyse des bactéries à la température non permissive. Le second a une mutation entraînant la formation de cellules filamenteuses caractéristique de perturbations dans la division (249).

##### (ii) DivIC

Chez *B. subtilis*, le gène *divIC* a été identifié grâce à la découverte du mutant *div-355*. Ce mutant a une duplication de séquence dans le gène *divIC* conduisant à un changement de séquence à partir de l'acide aminé 109 et à une augmentation de 7 acides aminés en C-terminal (149). Ce mutant thermosensible est incapable d'initier la formation de septum de division à température non permissive (177) et de septum polaire lors de la sporulation (149). Les cellules continuent à former leur paroi latérale et à ségréger leurs nucléoïdes, et donc filamentent.

## (iii) DivIB/FtsQ

De nombreuses mutations thermosensibles ont été découvertes dans le gène *divIB* chez *B. subtilis*. Les mutants *ts12* (36, 115, 191), *tms12* (27, 42), *div104* et *div105* (114) ont tous des mutations dans la partie C-terminale du domaine extra-cytoplasmique de DivIB. Ces mutants sont incapables d'initier la formation de septa à température non permissive. La synthèse d'ADN n'est pas altérée. Les nucléoïdes sont distribués régulièrement dans les filaments (27, 36). Il y a une légère augmentation du nombre de cellules après le passage à température non permissive (10%). Ceci serait dû au fait qu'une fois initiés, les septa naissants peuvent continuer à être fabriqués jusqu'à la séparation des cellules filles. Chez *B. subtilis*, DivIB a donc un rôle dans l'initiation du septum (27). La composition de la paroi en mucopeptides et en acides teichoïques n'est pas changée dans le mutant *tms12* (27). En revanche, certains indices montrent que la surface de ce mutant est altérée. En effet, les filaments ont tendance à s'agréger après deux heures à température non permissive et le culot de centrifugation obtenu après fixation des filaments par le tétra oxyde d'osmium est différent de celui obtenu avec les cellules sauvages (27). La composition en lipide et protéines membranaires est inchangée dans les filaments, à moins qu'elle ne soit changée localement (27).

Chez *E. coli*, il existe un mutant thermosensible filamenteux, nommé *ftsQ1(Ts)*.

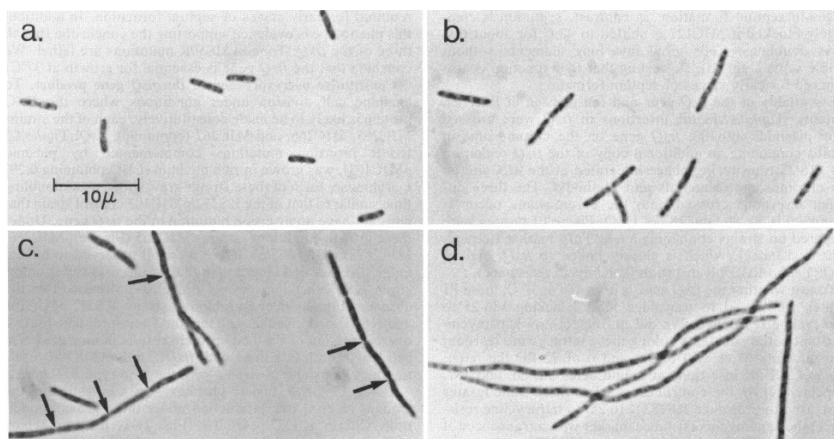


Figure 14. Morphologie des cellules *E. coli* (38) (a) de souche sauvage cultivée en milieu LB à 30°C (b) souche *ftsQ1(Ts)* cultivée à 30°C (c) *ftsQ1(Ts)* cultivée à 37°C (d) *ftsQ1(Ts)* cultivée à 42°C. (Carson *et al.*, 1991)

Ce mutant possède une mutation du glutamate conservé en position 125 en lysine dans la partie extra-cytoplasmique de FtsQ. Le phénotype de ce mutant varie selon le génotype des souches et les conditions de culture utilisées. Il forme soit des cellules filamenteuses sans septa (12) soit des cellules filamenteuses avec des septa partiels (240) à température non permissive. Carson *et al.* ont montré qu'à 30°C, les cellules sont normales mais un peu plus longues (150%) (Figure 14). A 37°C, les cellules filamentent mais les septa sont clairement visibles. A 42°C, la septation est complètement bloquée. FtsQ serait donc impliqué durant

tout le processus de septation (38). Dans tous les cas, cette mutation n'affecte ni la localisation ni la formation de l'anneau FtsZ (2).

En conclusion, l'étude de ces mutants thermosensibles montre que les protéines DivIB, DivIC et FtsL sont impliquées dans la division cellulaire. Pour DivIB/FtsQ, il y a des différences entre *E. coli* et *B. subtilis*. Les mutations présentes ne sont pas localisées au même endroit dans les séquences de DivIB et FtsQ. Il n'est pas clair si DivIB/FtsQ est impliqué dans l'initiation du septum de division ou la formation du septum durant tout le processus de division. Les différences de phénotype observé entre *E. coli* et *B. subtilis* pourraient être ou non liées aux différentes mutations. Il est vrai également que chez *E. coli* la même mutation produit des effets différents selon les souches et les conditions de culture.

### II.1.2 Phénotype des mutants de délétion

Les gènes *ftsL* (55, 101) et *ftsB/divIC* (33, 149) sont essentiels chez *E. coli* et *B. subtilis*. Chez *Streptomyces coelicolor*, la délétion des gènes *ftsL* et *divIC*, simple ou double est viable. Mais les hyphes aériens ne présentent pas de séparation claire entre les compartiments des pré-spores. La composition du milieu de culture module le phénotype de ces mutants. La culture en milieu minimum minimise la sévérité des défauts de division (14).

Le gène *ftsQ* est essentiel chez *E. coli* (38, 40). Chez *B. subtilis*, *divIB* est essentiel pour la division cellulaire et la viabilité à haute température (9, 143, 244). En effet, à 30°C, la délétion du gène n'affecte pas la viabilité. Le phénotype du mutant de délétion varie. Soit les cellules filamentent (9) (Figure 15A), soit les cellules légèrement plus longues que la souche sauvage forment des chaînettes (Figure 15B) (143, 244). D'autres décrivent une accumulation des chaînettes jusqu'en phase stationnaire chez *B. subtilis* à 30°C, en milieu DSM (Difco Sporulation medium) (207).

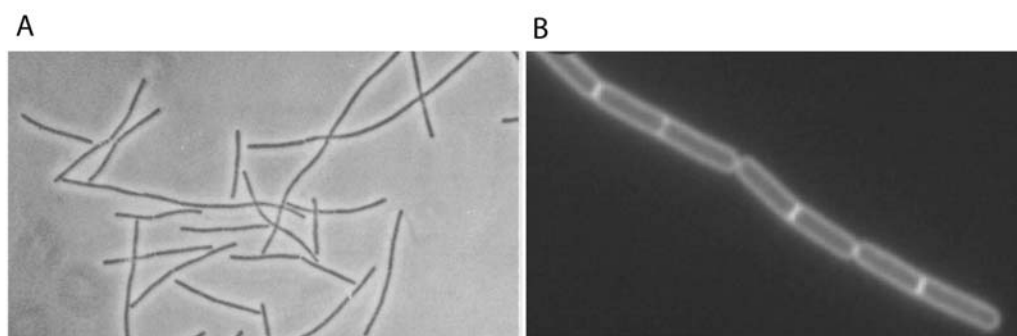


Figure 15. Morphologie de la souche de *B. subtilis* déletée de *divIB* cultivée à 30°C A. soit les cellules filamentent (Observation au microscope optique à contraste de phase) B. soit les cellules un peu plus longues que la souche sauvage forment des chaînettes (Les membranes des cellules sont marquées à l'aide du FM4-64) (Beal *et al.*, 1989 et Thompson *et al.*, 2006)

Alors que l'implication de DivIB dans la division végétative de *B. subtilis* à basse température est controversée, il est très clair que DivIB joue un rôle dans la division lors de la sporulation de *B. subtilis* (9, 79, 244). Le mutant de délétion sporule 75 fois moins bien que le sauvage. Quand un septa polaire est formé (dans 21% des cellules), il est soit incomplet soit beaucoup plus épais qu'un septa polaire normal (244).

La délétion du gène *ftsQ* a également été réalisée chez la bactérie à Gram positif *S. coelicolor* (176). Le gène *ftsQ*, tout comme *ftsZ*, est nécessaire pour la division végétative et la sporulation, mais n'est pas essentiel pour la viabilité du mycélium (15, 176).

Ces expériences de délétion de gènes ont montré que FtsL et DivIC sont essentielles pour la viabilité d'*E. coli* et *B. subtilis*. En ce qui concerne DivIB, il existe des différences quant à l'essentialité de cette protéine chez *B. subtilis* et *E. coli*.

### II.1.3 Phénotype des mutants de déplétion et de surexpression

La « déplétion » est un anglicisme qui indique une diminution de la quantité d'une protéine par régulation négative de la transcription du gène. Par la suite, je vais utiliser ce terme « déplétion » par commodité. Quand le gène est essentiel, la déplétion est un bon moyen d'étudier le phénotype associé à l'absence de la protéine. C'est le cas par exemple pour *ftsL* et *divIC*. Bien que les mutants thermosensibles nous aient déjà donné une idée du rôle cellulaire de ces deux protéines, il est intéressant de voir si la déplétion apporte de nouveaux éléments.

#### (i) Effet de la déplétion et de la surexpression de FtsL

Guzman *et al.* ont étudié l'effet de la déplétion de *ftsL* chez *E. coli*. Ils ont ajouté *ftsL* sur un plasmide sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose dans une souche déletée de *ftsL*. En présence du répresseur (glucose), les cellules filamentent très rapidement en milieu riche (Figure 16) et la croissance suivie par densité optique (DO) est inchangée. FtsL n'a donc pas de rôle dans la croissance de la paroi latérale mais bien dans la mise en place du septum (101).

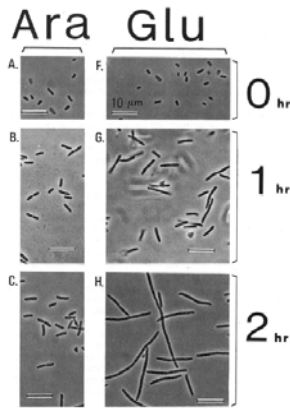


Figure 16. Phénotype des cellules d'*E. coli* déplétées de FtsL. Culture à 37°C en milieu riche contenant l'inducteur (L-arabinose 0.1%) jusqu'en phase stationnaire. Après lavage, les cellules sont ré-inoculées au 1/100 dans milieu riche contenant soit l'inducteur à 0.1% (A à C) soit le répresseur à 0.2% (F à H) pour 2h à 37°C. Au temps  $t = 0, 1, 2$ h les cellules sont fixées et observées au microscope optique à contraste de phase. Barre = 10µm (Guzman *et al.*, 1992)

En milieu minimum, la déplétion de FtsL chez *E. coli* entraîne l'apparition d'une variété de cellules de morphologie anormale, comme par exemple quelques bactéries en forme de Y (Figure 17). De tels défauts morphologiques ont déjà été observées dans d'autres situations, comme dans le double mutant *pbpA(Ts) ftsI(Ts)* ou lors de leur inactivations par l'ajout de  $\beta$ -lactamines (11, 232). Ceci indique que FtsL est impliquée d'une part dans la division cellulaire et dans le métabolisme du PG ou bien dans le couplage de ces deux processus (101).

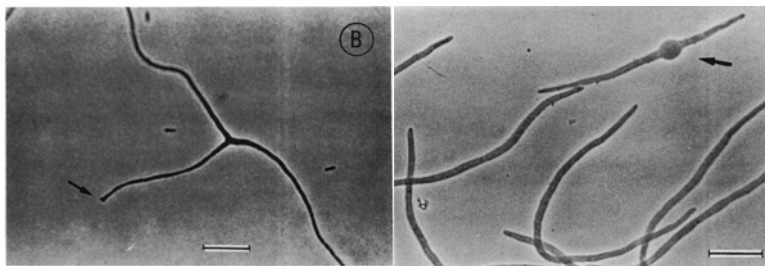


Figure 17. Morphologies aberrantes liées à la déplétion de FtsL en milieu minimum chez *E. coli*. Les cellules sont cultivées en milieu minimum glycérolé supplémenté en glucose à 37°C jusqu'en phase stationnaire. Barre = 10µm (Guzman *et al.*, 1992)

La surexpression de FtsL chez *E. coli* ne semble pas affecter la division cellulaire (88).

Chez *B. subtilis*, la déplétion de FtsL en milieu riche entraîne également un arrêt de la division et la filamentation des cellules (Figure 18). L'observation des cellules en microscopie électronique confirme l'absence de septa dans les filaments et la participation de FtsL à un stade précoce de la formation du septum (53). Par ailleurs, *ftsL* est impliqué dans la septation pendant la sporulation de *B. subtilis*. Il n'y a pas d'activation des facteurs  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$  dans la souche déplétée de FtsL (53).



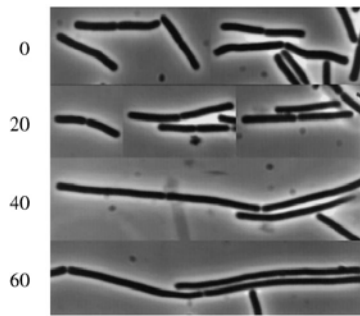


Figure 18. Phénotype des cellules de *B. subtilis* déplétées de FtsL. Image à contraste de phase prise après resuspension des cellules dans un milieu dépourvu d'inducteur pendant 0, 20, 40 et 60 minutes de culture. (Daniel *et al.*, 1998)

#### (ii) Effet de la déplétion de FtsB

La déplétion de FtsB chez *E. coli* entraîne la filamentation de la souche, alors que la ségrégation des nucléoïdes n'est pas affectée (Figure 19) (33). Cette expérience confirme le rôle de FtsB dans la division cellulaire.

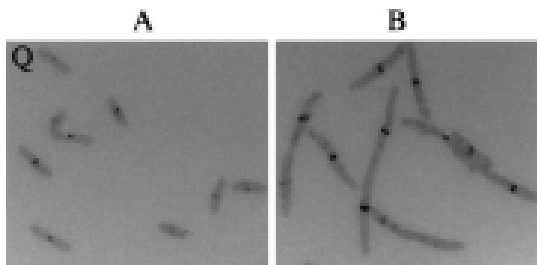


Figure 19. Phénotype des cellules d'*E. coli* déplétées de FtsB (A) présence de l'inducteur de *ftsB* (B) présence du répresseur de *ftsB*. (Buddelmeijer *et al.*, 2002)

Alors qu'en milieu riche solide, les souches dépletées de FtsB et DivIC ne forment pas de colonies sans complémentation (33, 149), en milieu minimum solide, le mutant est viable et forme majoritairement des cellules filamenteuses sans FtsB (Figure 20) (93).

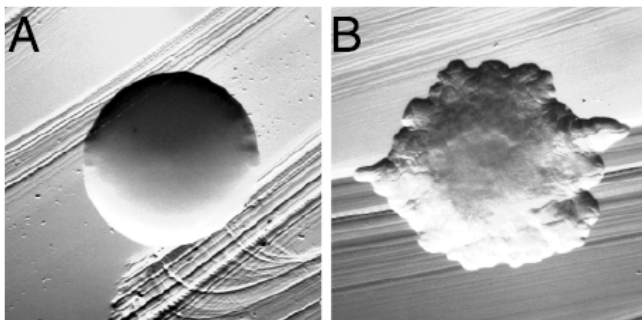


Figure 20. Phénotype des colonies formées en présence (A) ou en absence (B) de FtsB sur milieu minimum. (Goehring *et al.*, 2007)

#### (iii) Effet de la déplétion ou de la surexpression de DivIB/FtsQ

La déplétion de FtsQ chez *E. coli* en milieu riche entraîne l'apparition de filaments sans septa (Figure 21A) (38). D'autres équipes ont fait le même constat avec DivIB chez *B. subtilis* (36, 115, 164). Par ailleurs, la surexpression de FtsQ en milieu riche chez *E. coli* n'entraîne pas de défauts majeurs de division, bien que la longueur moyenne des cellules augmente. En revanche, sa surexpression en milieu minimum entraîne la formation de filaments avec de multiples septa chez *E. coli* (Figure 21B) (38). Chez *B. subtilis*, une surexpression de 150% en milieu riche ne modifie pas le phénotype des cellules (216).



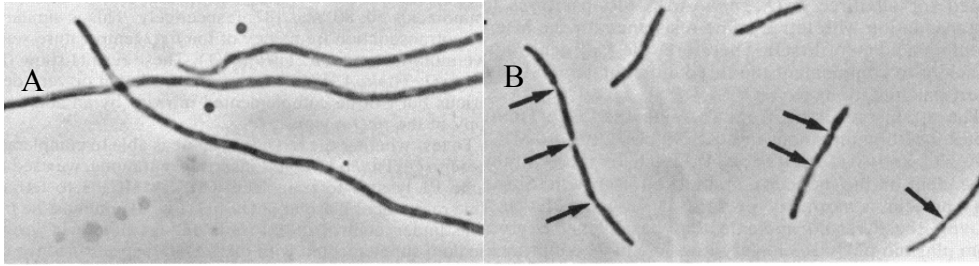


Figure 21. Phénotype de déplétion ou de surexpression de FtsQ chez *E. coli* A. Déplétion de FtsQ chez *E. coli* cultivée en milieu riche B. Surexpression de FtsQ chez *E. coli* cultivée en milieu minimum. (Carson *et al.*, 1991)

La composition du milieu de culture influence le phénotype d'essentialité et la morphologie des différentes souches. Les bactéries peuvent former des filaments naturellement en cas de raréfaction des nutriments dans leur environnement (272). Ainsi, elles augmenteraient leur surface d'échange avec le milieu pour capter plus de nutriments. Il serait donc possible que l'absence de ces protéines (DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL) donne un signal de « famine » à la cellule qui se mettrait alors à filamenter. Mais le plus probable au vu de toutes ces données, c'est que DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL ont un rôle direct dans la formation du septum de division et de sporulation. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation du septum restent inconnus.

## II.2 Fonctions envisagées

Récemment, Goranov *et al.* ont montré l'implication de FtsL dans la régulation de la division suite à un endommagement de l'ADN (97). En effet, la transcription de *ftsL* est régulée positivement par la protéine d'initiation de réplication de l'ADN, DnaA. Cette régulation pourrait servir à décaler la division lorsque la réplication de l'ADN est perturbée.

Par ailleurs, FtsL et EzrA pourrait réguler la constriction de l'anneau FtsZ chez *B. subtilis* (144). En effet, l'absence d'EzrA entraîne une hyperstabilisation des polymères de FtsZ *in vivo* et provoque l'accumulation d'anneaux sans constriction de la membrane. La surexpression de FtsL dans ces cellules supprime l'effet de la délétion du gène *ezrA*.

Certains auteurs ont spéculé que FtsQ est impliquée dans la synthèse du PG à un stade tardif de la division (40, 188). Il a été proposé que la différence d'abondance entre DivIB de *B. subtilis* et FtsQ d'*E. coli* pourrait être liée au fait que les bactéries à Gram positif comme *B. subtilis* ont besoin d'une synthèse de PG plus importante pour fabriquer une paroi plus épaisse. En outre, il faut noter qu'à ce jour, aucun orthologue de DivIB (FtsQ) n'a été identifié dans les bactéries ne possédant pas de paroi. De plus, une souche dérivée de *E. coli* K12 a été cultivée longtemps en présence de pénicilline et de sucrose sans traitement mutagénique

jusqu'à l'émergence d'un protoplaste de type L-form. Ce mutant appelé LW1655 F<sup>+</sup> est capable de se diviser sans paroi apparente ou détectée, ni membrane externe. L'étude des gènes de division de ce mutant a montré que *ftsQ* code pour une protéine tronquée dans son domaine périplasmique, laissant cependant le domaine  $\alpha$  intact. La partie manquante de ce FtsQ, incluant le domaine  $\beta$ , ne semble donc pas nécessaire à la division du protoplaste sans paroi (228), et donc pourrait être nécessaire à la division avec paroi. D'autre part, lorsque *divIB* est déleté chez *B. subtilis*, il en résulte une diminution de la sporulation (207). Quand les septa polaires sont complets (21% des cellules) ils sont plus épais, suggérant un rôle de DivIB dans la régulation de la synthèse du PG du septum polaire (207). Enfin, deux mutants *sib* pour « suppressor of *divIB* » ont été isolés en étalant sur boîte d'agar nutritif le mutant nul *divIB* à 49°C. Ces mutants supprimeurs présentent des mutations dans le gène *pbpB*. Or, *pbpB* code pour la protéine PBP2B dont la fonction connue est de synthétiser le PG septal lors de la division de *B. subtilis*. *Sib-2* génère la substitution V165E et *sib-5*, la substitution D213N. Ces mutations se trouvent dans le domaine N-terminal non catalytique de la partie extracellulaire de PBP2B. Ces expériences montrent que le changement d'un seul acide aminé dans la région N-terminale de PBP2B est suffisant pour contourner le besoin de DivIB dans la division cellulaire (54).

Le domaine  $\alpha$  de DivIB, correspond à un domaine POTRA (219, 254). Par analogie avec d'autres protéines possédant un domaine POTRA, il a été proposé que FtsQ, pourrait jouer un rôle de protéine chaperonne et/ou d'intervenir dans l'assemblage des protéines de la membrane externe (219).

Enfin, l'effet de la mutation *ftsQ1(Ts)* chez *E. coli* pourrait être supprimé par un changement dans l'enroulement de l'ADN. En effet, une insertion du transposon Tn10 dans la boîte -35 du gène *rho* supprime l'effet de la mutation *ftsQ1(Ts)*. Or, l'effet le plus remarquable de l'insertion Tn10 dans le promoteur *rho* est l'augmentation du niveau de super enroulement négatif de l'ADN (236).

Pour DivIC/FtsB, aucune fonction précise n'a jamais été suggérée au sein du complexe autre que de stabiliser FtsL (voir section C. III).

### III. Relation de DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL les unes avec les autres : stabilisation mutuelle

FtsL est une protéine connue pour être intrinsèquement instable chez *B. subtilis*. Une simple étape de centrifugation entraîne sa dégradation (51). Elle semble être régulée au cours du cycle cellulaire, plus abondante pendant la phase exponentielle et quasiment inexistante durant la phase stationnaire (51, 54). Les protéines instables sont fréquemment impliquées dans des processus de régulation (98). Grunenfelder *et al.* ont montré un rôle global de la protéolyse dans le contrôle du cycle cellulaire bactérien (99). Or, FtsL est le substrat de la métalloprotéase YluC (26) qui appartient à la famille des Site 2-Protéases (S2P). Les S2P sont des protéases impliquées dans la protéolyse intramembranaire régulée (ou RIP) (29). Elles jouent un rôle dans divers processus de régulation allant de la bactérie à l'homme et sont capables de cliver leur substrat dans les membranes (Figure 22).

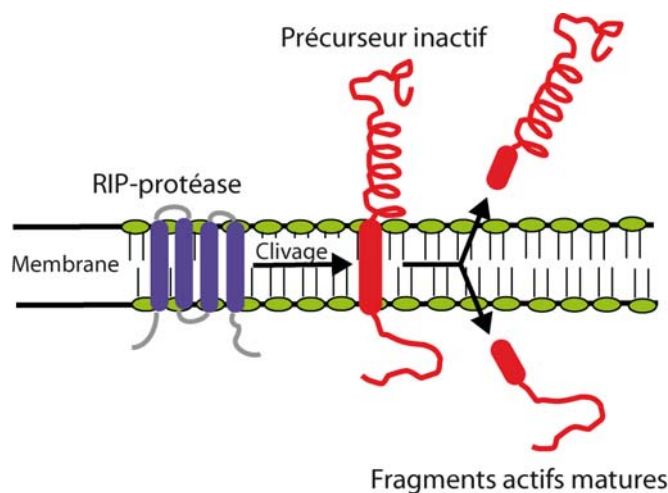


Figure 22 : Schéma général de la protéolyse intramembranaire régulée.

La protéolyse du substrat séquestré dans une membrane biologique permet la libération de domaines cytoplasmiques ou extracellulaires. Par exemple, chez *E. coli* RseP, libère  $\sigma^E$  de son facteur anti-sigma, RseA, activant ainsi la réponse spécifique  $\sigma^E$  (26). L'homologue chez *B. subtilis*, YluC, active  $\sigma^W$ , facteur impliqué dans la réponse à divers stress, en coupant son facteur anti-sigma RsiW (222). FtsL et RsiW possèdent des séquences identiques à proximité de la membrane. A ce jour, il n'est pas connu si les fragments résultants jouent un rôle ou si la dégradation de FtsL est importante en soi.

Chez *B. subtilis*, le phénotype d'essentialité d'un mutant nul pour *divIB* est dépendant de la température. Or, il a été démontré que dans un mutant thermosensible *tms12*, où DivIB est tronquée dans son domaine  $\beta$ , FtsL disparaît en moins de 10 minutes à température non

permissive. De plus, la surexpression de FtsL dans un mutant nul de *divIB* restaure la croissance à température non permissive. DivIB a donc un rôle dans la stabilisation de FtsL, médiée par sa partie extracellulaire et plus particulièrement son domaine  $\beta$  (51). Chez *E. coli*, la réduction de la quantité de FtsQ n'entraîne pas la diminution de la quantité de FtsL (32).

Chez *B. subtilis*, DivIB agirait comme un régulateur négatif de la quantité de la protéine DivIC. En effet, la quantité de DivIC diminue lorsque la quantité de FtsL chute en présence de DivIB (53). En revanche, en absence de DivIB, la quantité de DivIC ne diminue pas en absence de FtsL (54). La quantité de DivIC augmente même, en absence de FtsL et DivIB, quand on fait un saut à haute température (143). De plus, la surexpression de DivIB stimule la dégradation de DivIC mais n'agit pas sur la stabilité de FtsL (54). Il est peu probable que DivIB agisse sur la stabilité de DivIC de façon directe car il semble que DivIB ne puisse pas interagir avec DivIC sans la présence de FtsL (voir en dessous). Chez *B. subtilis*, la déplétion de PBP2B déstabilise DivIC et FtsL sans affecter la stabilité de DivIB (54).

L'expérience de déplétion de DivIC n'a pas été effectuée chez *B. subtilis* mais chez *E. coli*, la protéine FtsB, homologue de DivIC, contribue à la stabilité de FtsL. L'inverse en revanche n'est pas vrai (dans des conditions où FtsB est fusionnée à une étiquette FLAG qui pourrait influencer sa stabilité) (32). La présence de FtsQ sans FtsB chez *E. coli* ne suffit pas à stabiliser FtsL. Dans une souche déplétée en FtsQ, l'hétérodimère FtsL et FtsB n'est plus détecté par immuno-précipitation mais les quantités des deux protéines FtsL et FtsB ne sont pas diminuées (32).

Chez *B. subtilis*, l'absence ou la présence de DivIB influence les quantités de DivIC et FtsL. Chez *E. coli*, l'absence ou la présence de FtsQ semble n'influencer que la formation de l'hétéro-dimère FtsL/FtsB.

#### IV. Localisation et interdépendance pour leur recrutement au septum

La connaissance de la localisation cellulaire des protéines donne des indices sur leur fonction. Ceci a stimulé l'étude de la localisation des protéines par des techniques d'immunofluorescence et/ou de fusion GFP. En particulier, l'étude de la localisation des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL a montré que ces 3 protéines se localisent au site de division des cellules *E. coli* et *B. subtilis* (30, 33, 51, 88, 116, 141, 230, 258). Par conséquent, ces études de localisation ont renforcé l'idée que ces trois protéines jouent un rôle dans la formation du septum.

Chez *E. coli*, on a vu que le schéma de dépendance des protéines pour leur recrutement au septum est quasi linéaire, et que les protéines FtsQ, FtsL et FtsB sont centrales. FtsQ et FtsL ont besoin de FtsZ ((41), (88) respectivement), FtsA ((41), (88) respectivement) et FtsK (39) pour se localiser au septum, mais pas des dernières protéines recrutées FtsW (178), FtsI ((41), (88) respectivement) et FtsN (39). En revanche, FtsZ ((2), (88) respectivement) et FtsA ((4), (88) respectivement) n'ont pas besoin de FtsQ et FtsL, et FtsK n'a pas besoin de FtsQ (261). La dépendance de localisation de FtsQ envers FtsK peut être supprimée lorsque l'on fusionne FtsQ à ZapA, protéine cytoplasmique connue pour interagir avec FtsZ (91). Dans ce cas, même si le phénotype des cellules n'est pas normal, il y a recrutement de FtsL et FtsI, mais non de FtsN, au site de division d'*E. coli*. Ceci suggère qu'il n'y a pas d'effet coopératif de FtsK et FtsQ pour le recrutement de partenaires tardifs (91). FtsL et FtsI ont besoin de FtsQ pour se localiser. FtsB a besoin de FtsQ et FtsL pour se localiser mais pas de FtsW et FtsI. Contrairement à FtsQ, FtsL a besoin également de FtsB pour se localiser (bien qu'en raison des données de stabilité, le doute persiste) (Figure 8 et 24A, tableau 2).

Chez *B. subtilis*, il a été montré que la localisation de DivIB dépend de celle de FtsL, de DivIC, de PBP2B et de FtsZ. DivIC et FtsL dépendent de FtsZ pour leur localisation septale. PBP2B dépend de FtsZ, FtsL, DivIC et DivIB pour se localiser au site de division. FtsA dépend de FtsZ et non de DivIB pour se localiser au site de division (Figure 8 et 23B, tableau 3). La localisation de FtsW et FtsK(SpoIIIE) n'est pas connue chez *B. subtilis*. D'autres résultats de dépendance quant à la localisation au septum ont été publiés. Au vu des récentes données concernant les stabilités relatives de ces protéines à haute température ou en absence d'autres protéines (voir ci-dessus), il s'avère qu'il est plus prudent de parler de présence et non de localisation au site de division (Figure 23B) pour les dépendances

suivantes : la présence de FtsL et DivIC dépend de DivIB et PBP2B, la présence de DivIC dépend de FtsL et réciproquement. En effet, l'absence de localisation observée n'est sans doute dans ces cas que la conséquence de l'absence complète des protéines dans la cellule.

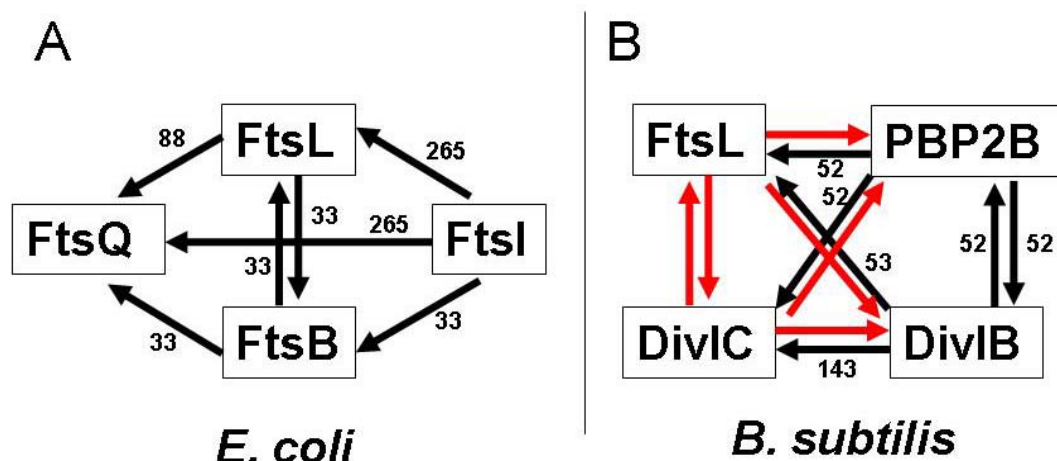


Figure 23 : Schéma de dépendance des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB, FtsL et PBP2B/FtsI pour leur localisation au septum (en noir) et leur présence (en rouge) chez *B. subtilis* et *E. coli*. La flèche indique: « dépend de la protéine au bout de la flèche ».

Il existe quelques différences entre *E. coli* et *B. subtilis* dans ce schéma de dépendance pour la localisation au septum, notamment en ce qui concerne DivIB/FtsQ, qui nécessite la présence de PBP2B chez *B. subtilis* alors que ce n'est pas le cas chez *E. coli*. D'autre part, DivIB nécessite la présence de DivIC et FtsL pour se localiser au septum de *B. subtilis*, ce qui n'est pas le cas chez *E. coli*, où il a été établi que FtsQ peut se localiser en absence de FtsL et FtsB.

## V. Interactions

Le schéma d'interdépendance de ces protéines pour leur localisation au septum ainsi que les données de stabilité relative suggèrent des interactions entre ces protéines.

### V.1 Méthodes biochimiques : interaction entre DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL ?

La présence des domaines coiled-coil dans les parties extra-cytoplasmique de FtsL et DivIC/FtsB suggère une interaction entre ces deux protéines. Cependant, deux équipes ont émis des conclusions divergentes quand cette hétéro-dimérisation (213, 230).

## V.2 Test de double et triple hybride de levure et bactérien

L'existence de nombreuses interactions entre les protéines de la division d'*E. coli* a été démontrée par des systèmes double hybride bactériens (70, 139) (vu dans la section B.VI.2). FtsQ interagit dans les systèmes doubles hybrides avec de nombreuses protéines de la division (FtsA, FtsK, FtsX, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN, et YmgF) (46, 70, 139), tout comme FtsL qui interagit avec FtsQ, FtsB, FtsW, FtsI, FtsK et FtsN. En revanche FtsB interagit faiblement avec quelques partenaires, FtsQ, FtsL et FtsN (139).

La surexpression d'une troisième protéine non marquée, c'est-à-dire non fusionnée à un domaine pour le test double hybride, peut moduler ces interactions. La surexpression peut diminuer des interactions existantes (139). C'est le cas par exemple, pour l'interaction entre FtsI et FtsL, qui est fortement diminuée par la présence de FtsL non marqué. Par ailleurs, l'addition de FtsL non marquée n'entraîne pas de nouvelles interactions entre FtsI et d'autres protéines de la division. En revanche, l'ajout de FtsL non marquée favorise l'interaction entre les deux protéines FtsQ et FtsB, ainsi qu'entre FtsB et FtsW. Ces observations démontrent que FtsL FtsQ FtsB et FtsB FtsL FtsW forment des complexes ternaires chez *E. coli* (139).

Pour les protéines de *B. subtilis*, un système triple-hybride de levure a été utilisé pour détecter des interactions entre les protéines DivIB, DivIC et FtsL. Les protéines membranaires entières de DivIB, DivIC, FtsL et PBP2B ont été fusionnées au domaine de liaison à l'ADN (BD) et au domaine d'activation (AD) de Gal4 dans différentes combinaisons et exprimées en présence d'une troisième protéine non marquée (3HB) (Figure 24). Dans ce système, DivIB n'interagit pas avec lui-même, ni avec DivIC, FtsL ou PBP2B.

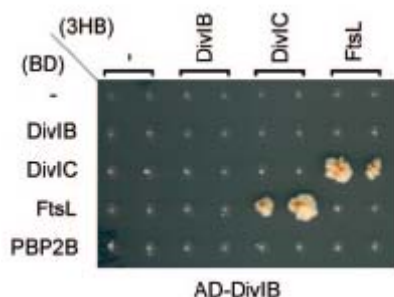


Figure 24. Existence d'un complexe ternaire DivIB, DivIC et FtsL révélé par un système triple hybride de levure. DivIB, DivIC, FtsL et PBP2B sont exprimées en fusion avec le domaine BD (à gauche) ou sans fusion (3HB) (en haut) et DivIB est fusionnée au domaine d'activation Gal4(AD). Les contrôles négatifs sont le domaine de liaison seul (BD) et le vecteur exprimant normalement la troisième protéine, vide. Les levures poussent quand il y a interaction. (Daniel *et al.*, 2006)

En revanche, l'existence du complexe ternaire DivIB, DivIC et FtsL a été démontrée. En effet, il y a interaction entre DivIB et FtsL quand DivIC est exprimée sans fusion (non marquée) et, entre DivIB et DivIC quand FtsL est exprimée sans fusion (54).

Cependant, les auteurs ont décidé de poursuivre leurs efforts de caractérisation des interactions deux à deux en utilisant le système double hybride bactérien BACTH cité

précédemment qui est bien adapté pour les protéines membranaires (139). Dans ce cas, il montre que DivIB, FtsL et PBP2B sont capables d'interagir avec elles même, contrairement à DivIC (54). FtsL interagit avec DivIB, PBP2B et fortement avec DivIC. DivIB, PBP2B et FtsL interagissent toutes les unes avec les autres mais elles n'interagissent pas avec DivIC.

### V.3 Expériences de co-immunoprécipitation

Buddelmeijer *et al.* ont montré que FtsL et FtsB forment chez *E. coli* un complexe *in vivo* par co-immunoprécipitation. Dans une souche déplétée en FtsQ, le complexe FtsL et FtsB n'est plus co-immunoprécipité. Comme FtsQ, est également immunoprécipité avec FtsL et FtsB, il est fort probable qu'ils forment un complexe *in vivo* et que FtsQ soit nécessaire à la stabilisation de ce complexe (32). L'existence du complexe entre FtsQ, FtsB et FtsL a pu être démontrée en absence de FtsK (32).

FtsL, DivIB/FtsQ et PBP2B/FtsI interagissent les unes avec les autres. DivIC/FtsB interagit avec FtsL, plus ou moins fortement selon les organismes. L'association de DivIC/FtsB avec d'autres protéines comme DivIB/FtsQ et FtsW requiert l'interaction avec FtsL. Le complexe ternaire FtsQ FtsL FtsB existe *in vivo*. FtsK n'est pas nécessaire à la formation de ce complexe.

## VI. Dissection moléculaire du complexe

Nous venons de voir que les trois protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL se localisent au site de division des bactéries *E. coli* et *B. subtilis*, et qu'elles sont centrales dans le schéma de dépendance mutuelles des protéines de la division au septum. Il est donc supposé que ce complexe pourrait être important pour la régulation de processus intra- et extra-cytoplasmique au cours de la division. Les domaines intra-, ou extra-cytoplasmique de ces protéines sont-ils important pour leur fonction ? Qu'en est-il des domaines important pour leur localisation ? Enfin, quels sont les épitopes d'interaction de ce complexe ? Sont-ils conservés entre *B. subtilis* et *E. coli* ?

Les trois domaines (cytoplasmique, transmembranaire et extra-cytoplasmique) de FtsL sont nécessaires à sa fonction chez *E. coli* (102). Seules les parties extra-cytoplasmique et transmembranaire sont essentielles pour sa localisation septale (87). Chez *B. subtilis*, le remplacement du domaine cytoplasmique de FtsL par celui de DivIC n'affecte pas la division



cellulaire. Ceci tend à démontrer que chez *B. subtilis*, le domaine cytoplasmique de FtsL n'est pas essentiel à la division (26).

Chez *E. coli*, les substitutions L70H et L84D ou le remplacement du motif coiled-coil entier de FtsL par des domaines leucine zippers connus perturbe sa localisation (87). De plus, l'homologue de FtsL chez *Haemophilus influenzae* (40% d'identité de séquence) ne complémente pas un mutant nul *ftsL* chez *E. coli*. Curieusement, chez *B. subtilis*, la mutagenèse des leucines équivalentes 69 et 83 dans la partie extra-cellulaire ne perturbe pas le phénotype des bactéries (229). D'autre part, le domaine coiled-coil peut être remplacé par des coiled-coil hétérologue ayant une identité de séquence de 35% sans perturber la division cellulaire (229). Il semble donc que chez *B. subtilis*, FtsL soit une protéine plus malléable qui s'accommode d'un grand nombre de changement sans perte de fonction.

Le domaine extra-cytoplasmique de DivIC de *B. subtilis*, ancré à la membrane par un segment transmembranaire étranger, est suffisant pour sa localisation au site de division et la complémentation d'un mutant nul à 30°C. En revanche, les domaines cytoplasmiques et transmembranaires natifs de DivIC sont importants pour la division à haute température (142).

La complémentation d'un mutant de délétion de *ftsL* par une construction codant un FtsL fusionné à l'étiquette HA en C-terminal est viable et donc FtsL-HA fonctionnelle. En revanche, il est impossible de combiner la présence de cette construction avec la mutation *divIC355<sup>ts</sup>*, qui code pour la protéine DivIC modifiée dans sa partie C-terminale. Le phénotype de létalité synthétique de ces deux protéines modifiées dans leur partie C-terminale renforce l'idée que les parties C-terminales des domaines extracellulaires de FtsL et DivIC sont importantes pour leur fonction (54).

Chez *E. coli*, la partie périplasmique de FtsQ semble nécessaire pour sa localisation et sa fonction (30, 41, 102). Ceci a également été démontré chez *B. subtilis* (142). Cependant, certains auteurs déclarent que la partie cytoplasmique est nécessaire pour l'activité et/ou la localisation de FtsQ (71, 102). Soutenant cette idée, Karimova *et al.* (139) ont montré que 18 acides aminés en N-terminal du domaine cytoplasmique sont nécessaires à FtsQ d'*E. coli* pour interagir avec FtsA. Geissler *et al.* ont montré que les parties cytoplasmique et transmembranaire de FtsQ sont suffisantes pour partiellement supprimer l'effet de la délétion de *ftsK* chez *E. coli* (85).

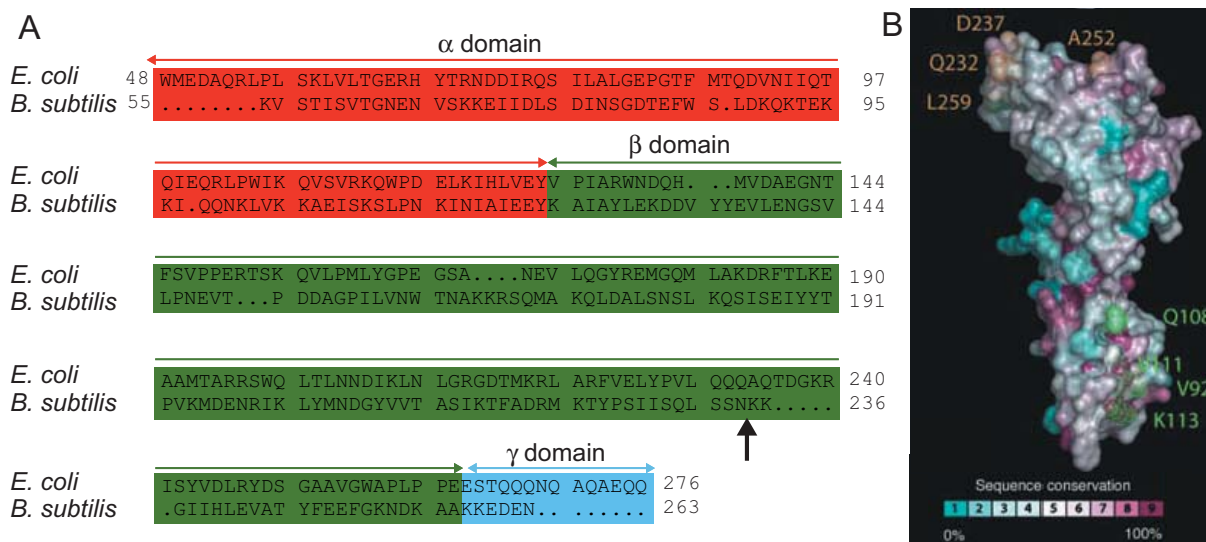


Figure 25. Domaines et épitopes importants pour la fonction de DivIB/FtsQ. A. Alignement des séquences du domaine extracellulaire de FtsQ d'*E. coli* et DivIB de *B. subtilis*. La flèche indique la fin du domaine β obtenu par protéolyse du domaine extracellulaire de DivIB de *G. stearothermophilus*. B. Structure cristallographique du domaine extracellulaire de FtsQ d'*E. coli*. Les épitopes de localisation de FtsQ sont coloriés en vert. Les épitopes de recrutement de FtsL et FtsB au site de division sont coloriés en orange. (D'après Van den Ent *et al.*, 2008)

DivIB/FtsQ possède plusieurs signaux de localisation septale ; un épitope dans le segment transmembranaire, un épitope dans le domaine α, et un épitope dans la partie C-terminale du domaine β (254, 258). Ces épitopes sont redondants et pas tous importants pour la fonction de DivIB dans la division. Ce qui est cohérent avec les données d'interaction qui montrent que DivIB/FtsQ interagit avec beaucoup de protéines du divisome. Pour se localiser au septum, FtsQ nécessite la présence de FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK et FtsX. Les trois premières étant cytoplasmiques, il est plus probable que FtsK et/ou FtsX soient responsables du recrutement de FtsQ au septum. Les mutations des résidus V92, Q108, V111 et K113 localisés dans le domaine α, sont connues pour affecter la localisation septale de FtsQ à priori sans perturber sa structure (Figure 25) (254). Elles sont proches de la membrane et probablement impliquées dans l'interaction de FtsQ avec FtsK ou FtsX.

Le domaine transmembranaire de FtsQ/DivIB contient également un épitope de localisation septale (220, 258), comme FtsL et FtsI (87, 267).

Dans le schéma de dépendance mutuelle pour le recrutement au site de division d'*E. coli*, FtsQ est nécessaire au recrutement de FtsL et FtsB (33, 41). Or, la région C-terminale du domaine β est importante pour le recrutement au septum de FtsL et FtsB (40, 93). Chez *B. subtilis*, FtsL et DivIC sont nécessaires au recrutement de DivIB (53, 143). Or la région C-terminale du domaine β est importante pour sa localisation septale (258). En conclusion, il est fort probable que la région C-terminale du domaine β de DivIB/FtsQ est importante pour

l'interaction avec FtsL et probablement DivIC/FtsB, et pour sa localisation au site de division. Il est concevable que les résidus Q232, D237, A252, et L259 situés dans la partie C-terminale du domaine  $\beta$  de FtsQ d'*E. coli* soient en partie responsables de l'interaction avec FtsL (Figure 25) (254).

Les protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL sont des protéines bitopiques dont les trois domaines semblent plus ou moins importants pour leur fonction. Ceci est donc cohérent avec un rôle de liaison de processus intra- et extra-cytoplasmique.

DivIB possède plusieurs signaux de localisation au septum, qui ne sont pas tous importants pour la fonction de DivIB dans la division cellulaire. L'existence de signaux de localisation multiples renforce l'idée que DivIB puisse être une protéine de connexion importante pour l'assemblage du divisome (256). Un épitope de localisation septale, probablement impliqué dans l'interaction avec FtsK et/ou FtsX se trouve dans le domaine N-terminal  $\alpha$  du domaine extra-cytoplasmique. Un épitope probable d'interaction avec FtsL se trouve dans la partie C-terminale du domaine  $\beta$ .



## PRESENTATION ET OBJECTIF DES TRAVAUX

### CONTEXTE

La division bactérienne a été principalement étudiée chez les deux bacilles *E. coli* et *B. subtilis*. *S. pneumoniae* est une bactérie pathogène de morphologie intermédiaire entre les coques et les bacilles. Malgré quelques différences dans leur processus de recrutement chez *E. coli* et *B. subtilis*, DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL sont centrales dans ce processus de recrutement au site de division. La formation d'un complexe ternaire était suggérée par des données de dépendance de recrutement et de stabilisation mutuelle chez les deux bacilles. Il a été isolé par co-immunopurification chez *E. coli*. Au laboratoire, Marjolaine et André ont démontré l'existence du complexe ternaire *in vitro* par co-purification des protéines recombinantes solubles.

### OBJECTIF DES TRAVAUX

Ce travail de thèse avait pour objectif de faire progresser nos connaissances sur la fonction d'un complexe de trois protéines, DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL, centrales au processus de division chez les bactéries. La bactérie *S. pneumoniae* a été choisie en raison du peu de connaissances actuelles sur la division des ovocoques par rapport à celles des bacilles et du fait qu'il s'agit d'un pathogène majeur pour l'homme. Nous avons combiné des études *in vivo* chez le pneumocoque avec des analyses biochimiques permettant d'établir les relations entre les trois protéines du complexe ternaire.

Cet objectif général a été poursuivi de trois façons :

1. Quels sont les paramètres cinétiques de formation du complexe ternaire reconstitué *in vitro* ?
2. Peut-on reconstituer ce complexe avec les protéines membranaires entières dans un système recombinant *in vivo* ?
3. Quel est le rôle du complexe ternaire dans la division? DivIB, DivIC et FtsL sont-elles essentielles à la division d'un ovocoque à Gram positif? Quelle est la quantité de protéines présentes *in vivo* ? Diffère-elle significativement entre les bactéries à Gram positif possédant une paroi plus épaisse et les bactéries à Gram négatif ? Ce complexe a-t-il un rôle dans la synthèse de la paroi ?



## CONTRIBUTIONS AUX TRAVAUX

Le projet a été initié par André Zapun, mon superviseur direct et Marjolaine Noirclerc-Savoye au sein du Laboratoire d'ingénierie des macromolécules. Dans la publication n°1, j'ai effectué les quantifications de FtsL, DivIC et DivIB chez *S. pneumoniae*. Dans la publication n°2, la microscopie à balayage a été réalisée par l'équipe d'Orietta Massidda, la microscopie électronique à transmission en coloration négative par Daphna Fenel (IBS), et la microscopie à transmission en coupe par Anne Marie Di Guilmi (IBS).

Pour le reste des expériences citées, je les ai toutes réalisées seule avec le soutien d'André et les conseils avisés de Marjolaine.

Par ailleurs, Orietta Massida m'a aidé à concevoir les oligonucléotides pour la délétion des gènes chez le pneumocoque et m'a appris les techniques classiques de microbiologie du pneumocoque.

Nicole Thielens et Gregory De Crescenzo m'ont aidé dans ma démarche d'utilisation du BIACORE® et des surfaces de détection NTA.





## **PRESENTATION DE LA PUBLICATION N° 1**

Noirclerc-Savoye, M., Le Gouellec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., Zapun, A. (2005) *In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **55** (2): 413-424.

### **OBJECTIF**

Je souhaite rappeler aux lecteurs que ma contribution dans cet article a été de quantifier *in vivo* les protéines DivIB, DivIC, FtsL, PBP2x et PBP2b. J'ai choisie d'intégrer la publication à mon manuscrit d'une part, parce que j'ai contribué à la réalisation d'une partie des résultats mais également car elle permet de replacer mon travail dans son contexte. Enfin, j'ai souhaité détailler la démarche expérimentale.



# ***In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae***

Marjolaine Noirclerc-Savoye,<sup>1</sup> Audrey Le Gouëllec,<sup>1</sup> Cécile Morlot,<sup>1</sup> Otto Dideberg,<sup>2</sup> Thierry Vernet<sup>1\*</sup> and André Zapun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules and

<sup>2</sup>Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS UMR 5075/UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France.

## **Summary**

DivIB, DivIC and FtsL are bacterial proteins essential for cell division, which show interdependencies for their stabilities and localization. We have reconstituted *in vitro* a trimeric complex consisting of the recombinant extracellular domains of the three proteins from *Streptococcus pneumoniae*. The extracellular domain of DivIB was found to associate with a heterodimer of those of DivIC and FtsL. The heterodimerization of DivIC and FtsL was artificially constrained by fusion with interacting coiled-coils. Immunofluorescence experiments showed that DivIC is always localized at mid-cell, in contrast to DivIB and FtsL, which are co-localized with DivIC only during septation. Taken together, our data suggest that assembly of the trimeric complex DivIB/DivIC/FtsL is regulated during the cell cycle through controlled formation of the DivIC/FtsL heterodimer.

## **Introduction**

Cell division is a fundamental process of life that is still poorly understood in bacteria, even though all the key proteins involved are probably known. Eight conserved essential proteins are present in cell wall containing eubacteria: FtsZ, FtsA, FtsK, DivIB(FtsQ), FtsL, DivIC(FtsB), FtsW and FtsI. Several studies have shown dependencies between the division proteins for their recruitment at mid-cell, with some variation between the model organisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsZ polymerizes as a ring at the division site.

FtsA binds to FtsZ, and both proteins are thought to drive membrane invagination. FtsK is involved in the segregation of chromosomes (Aussel *et al.*, 2002), but certainly plays another function essential for division (Draper *et al.*, 1998). FtsI participates in cell wall synthesis (Pisabarro *et al.*, 1986), and so does probably FtsW (Errington *et al.*, 2003). In contrast, the role of DivIB(FtsQ), DivIC(FtsB) and FtsL is largely unknown. The Fts and Div nomenclature are derived from *E. coli* and *B. subtilis* studies, respectively (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). DivIC(FtsB) is also known as YgbQ in *E. coli* (Buddelmeijer *et al.*, 2002). Given the weak sequence similarity between the DivIB, DivIC and FtsQ, FtsB proteins and the differences in behaviour observed in *B. subtilis* and *E. coli*, the Fts nomenclature is used for Gram-negative bacteria, whereas Div names are applied to proteins from Gram-positive bacteria such as our model organism *Streptococcus pneumoniae*.

DivIB(FtsQ), DivIC(FtsB) and FtsL share similar topologies and display a short amino-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane segment and a longer extracellular domain (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). In *B. subtilis*, the three proteins show codependence of their localization at the division site (Daniel *et al.*, 1998; Daniel and Errington, 2000; Katis *et al.*, 2000). In *E. coli*, FtsQ is localized to the division site in the absence of FtsL and FtsB (Chen *et al.*, 1999; Buddelmeijer *et al.*, 2002), whereas the presence of FtsL and FtsB at the division site is mutually dependent and requires FtsQ (Ghigo *et al.*, 1999; Buddelmeijer *et al.*, 2002). Furthermore, DivIC is degraded in the absence of FtsL in *B. subtilis* (Daniel *et al.*, 1998), which is itself an intrinsically unstable protein *in vivo* that is stabilized by DivIB (Daniel and Errington, 2000). Conversely in *E. coli*, FtsL is rapidly degraded in the absence of FtsB (Buddelmeijer *et al.*, 2002). Taken together, these findings suggest that these three proteins interact. However, no physical interaction that involves DivIB has been demonstrated yet, whereas there are conflicting reports regarding the heterodimerization of FtsL and DivIC from *B. subtilis* (Sievers and Errington, 2000; Robson *et al.*, 2002). The interaction of FtsQ, FtsL and FtsB has recently been established in *E. coli in vivo* by immunoprecipitation (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). As the

Accepted 24 September, 2004. \*For correspondence. E-mail thierry.vernet@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 96 81; Fax (+33) 4 38 78 54 94.

immunoprecipitates were analysed by immunoblot revealing only the proteins of interest, there remains the formal possibility that the interactions were mediated by additional unidentified components. We report here the reconstitution *in vitro* of a trimeric complex consisting of the recombinant extracellular domains of DivIB, DivIC and FtsL from *S. pneumoniae*, with the dimerization of those of DivIC and FtsL constrained by fusion with artificial coiled-coils.

DivIB(FtsQ) comprises a conserved extracellular domain of about 200 residues that is required for its function and localization (Guzman *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Katis and Wake, 1999; Katis *et al.*, 2000). DivIC(FtsB) and FtsL are small proteins with a predicted coiled-coil motif spanning most of their extracellular domain of about 75 residues (Guzman *et al.*, 1992; Levin and Losick, 1994). Coiled-coil peptides are  $\alpha$ -helices that interact along their length and usually mediate protein–protein interactions (Lupas, 1996). The coiled-coil motif of FtsL and DivIC(FtsB), together with the codependence of their localization suggests the formation of a heterodimer *in vivo*. Following our own failure to demonstrate interactions *in vitro* between the recombinant extracellular domain of DivIB, DivIC and FtsL, we hypothesized that the dimerization of DivIC and FtsL is prerequisite for binding to DivIB. We therefore decided to replace the cytoplasmic and transmembrane regions of FtsL and DivIC by artificial coiled-coils in order to force their dimerization in solution. The reason underlying this approach was the report that the transmembrane segment of FtsL from *E. coli* appears to be required for its oligomerization when over-expressed (Ghigo and Beckwith, 2000). The importance of the transmembrane segment of FtsL for its participation in a complex comprising FtsB has since been demonstrated in *E. coli* by the failure to coimmunoprecipitate FtsB with chimeras of FtsL that have alternative transmembrane helices (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). The artificial coiled-coils were chosen in order to control the hetero- and homodimerization of the extracellular domains of FtsL and DivIC. We then tested if the extracellular domain of DivIB could bind to the hypothetical homo- and heterodimers of DivIC and FtsL. We found that the association of FtsL and DivIC is required for interaction with DivIB, whereas homodimers did not bind to DivIB.

We have used immunofluorescence microscopy to determine the localization of DivIB, FtsL and DivIC during the cell cycle of *S. pneumoniae*. DivIC was always found at the division site, whereas DivIB and FtsL are localized at mid-cell only during septation. Taken together, our results indicate that DivIB, FtsL and DivIC form a septal trimeric complex, and that formation of this complex is likely controlled by events on the cytoplasmic and/or transmembrane regions of FtsL and DivIC.

## Results

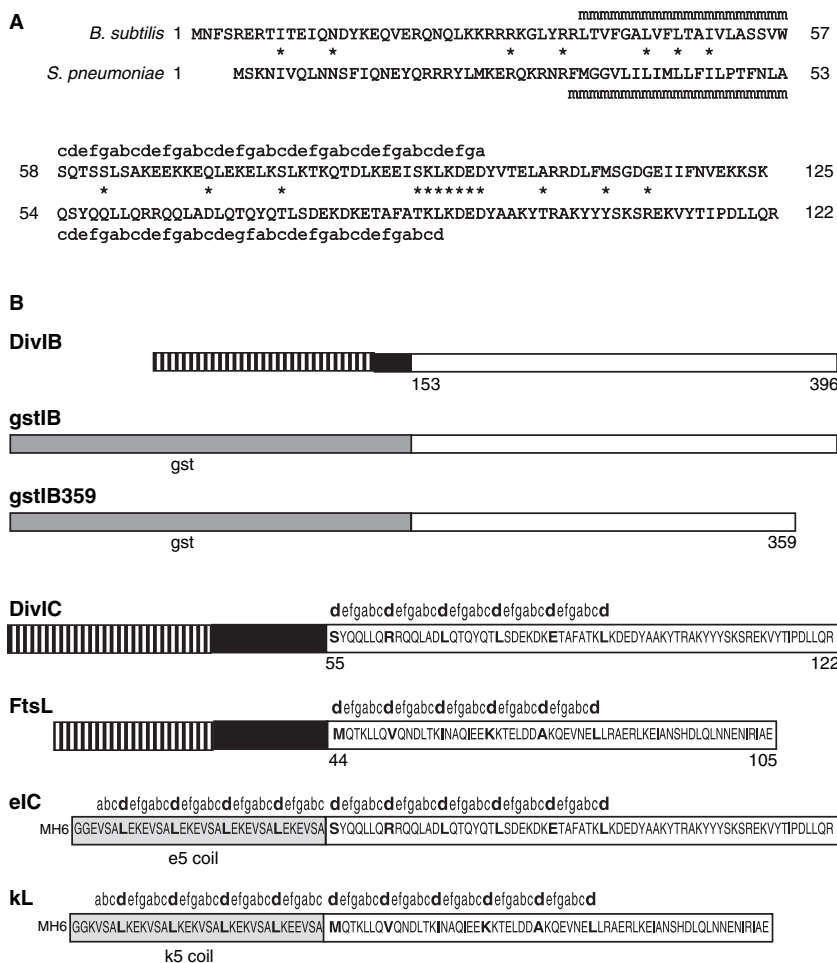
### Identification of DivIC from *S. pneumoniae*

The identification of a DivIC homologue (FtsB) in *E. coli* and *Vibrio cholerae* prompted us to search for a homologue in *S. pneumoniae*. Searches using WU-BLAST and NCBI-BLAST with the DivIC sequence from *B. subtilis* yielded numerous sequences of which the best match originating from *S. pneumoniae* was from the open reading frame SP0008. However, with a very low BLAST score, this finding required closer examination. The subset of proteins that had approximate lengths of 100 residues and contained a single transmembrane segment were selected from the BLAST results and aligned with CLUSTALW. A pattern of 47 amino acids (Supplementary material, Fig. S1) was identified and used to search the *S. pneumoniae* genomes with PATTINPROT ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_pattinprot.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_pattinprot.html)). A single sequence was retrieved, corresponding to protein SP0008 (accession numbers Q97TC8 and Q8CZD2 in strains TIGR4 and R6).

SP0008 is a predicted bitopic membrane protein of 122 amino acids. Residues Q54–R122 are predicted to be extracellular. Residues S55–L90, which follow the transmembrane segment, were predicted to form a coiled-coil using the COILS 2.1 program, as is found in other FtsL and DivIC homologues. When SP0008 and DivIC from *B. subtilis* were aligned with the program SIM without gap, the predicted transmembrane segment were correctly aligned and most importantly, the predicted coiled-coils positions (a to g) of individual residues were also aligned (Fig. 1A). With this alignment the level of sequence identity of SP0008 with DivIC from *B. subtilis* is 16.4% over the entire sequence of SP0008, a low value. As the localization of SP0008 to the division site of *S. pneumoniae* was demonstrated by immunofluorescence microscopy (see below), we decided to rename the protein DivIC.

### The extracellular domains of DivIB associates with a dimer of FtsL and DivIC to form an obligatory ternary complex

Previous studies have shown interdependencies for the localization at the division site of DivIB(FtsQ), DivIC(FtsB), and FtsL (Katis *et al.*, 2000; Buddelmeijer *et al.*, 2002), suggesting that these proteins may physically interact. The most direct evidence to date is the coimmunoprecipitation of FtsQ, FtsB and FtsL in *E. coli* (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). In order to demonstrate the interaction while using soluble proteins, we chose to concentrate on the extracellular domains as they are required for targeting to the division site (Chen *et al.*, 1999; Ghigo and Beckwith, 2000; Katis *et al.*, 2000). Initial experiments showed that the recombinant



**Fig. 1.** A. Alignment of DivIC from *B. subtilis* and *S. pneumoniae*. Identical residues are highlighted with stars. The predicted transmembrane regions (mmm . . .) and coiled-coil positions (a to g) are signalled above and below their respective sequences.

B. Construction of the *gstIIB*, *eIC* and *kL* fusion proteins. The primary structure of *DivIb*, *DivIC* and *FtsL* consists of a cytoplasmic domain (hatched), a transmembrane segment (black) and an extracellular domain (white). The extracellular domain of *DivIb* was fused to *gst* (dark grey) with intervening thrombin and TEV protease cleavage sites. To produce the soluble interacting proteins *eIC* and *kL*, the *e5-* and *k5-coils* (light grey) have been fused to the extracellular domain of *DivIC* and *FtsL*, respectively. The a to f positions of the predicted coiled-coil regions are indicated, the d position is in boldface.

extracellular domains alone did not interact. In particular, the extracellular regions of FtsL and DivIC were not folded as the latter one forms inclusion bodies in *E. coli* whereas the former one was found to be unstructured by <sup>1</sup>H-NMR. These proteins did not form either homo- or heterodimers in solution, as reported with proteins from *B. subtilis* and *Bacillus stearothermophilus* (Robson *et al.*, 2002), despite the predicted possibility of a coiled-coil interaction. It is known, however, that the dissociation constant of a coiled-coil dimer decreases with the length of the interacting helices (Chao *et al.*, 1996). It is therefore possible that the recombinant extracellular domains of FtsL and DivIC are simply too short to interact in solution. In addition, the transmembrane segment of *E. coli* FtsL was found to be important for its targeting and oligomerization when overexpressed (Ghigo and Beckwith, 2000), and more recently for its participation to a complex comprising FtsB (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). These results indicate that the oligomerization region may extend through the membrane (Ghigo and Beckwith, 2000; Buddelmeijer and Beckwith, 2004). Therefore, we hypothesized that forcing the homo- or heterodimeriza-

tion of the extracellular domains of FtsL and DivIC might generate artificial soluble species able to bind to the extracellular region of DivIB.

Dimerization was obtained by fusion with the artificial coiled-coil peptides e5 and k5, which are known to form a heterodimer as a result of their complementarity of charge, with a nanomolar dissociation constant (Chao *et al.*, 1996). The fusions were made on the N-terminal side of the extracellular domains of FtsL and DivIC to mimic the potential role of the transmembrane helices in the interaction. Care was taken not to break the register of the predicted coiled-coil. A N-terminal His-tag was added for metal-affinity purification. In the two proteins described in Fig. 1B, the k5- and e5-coils were fused to the extracellular domain of FtsL and DivIC, to give rise to kL and eIC fusion proteins, respectively. The extracellular domain of DivIB was fused to the glutathione-S-transferase tag (gstIB), to allow purification by glutathione-affinity. Note that we designate the extracellular regions by the last letters of the protein names (i.e. IB for that of DivIB, IC for that of DivIC, and L for that of FtsL), whereas the fused polypeptide is designated by an abbreviation in

lower case (i.e. gst for glutathione-S-transferase, e for His-tagged e5 and k for His-tagged k5).

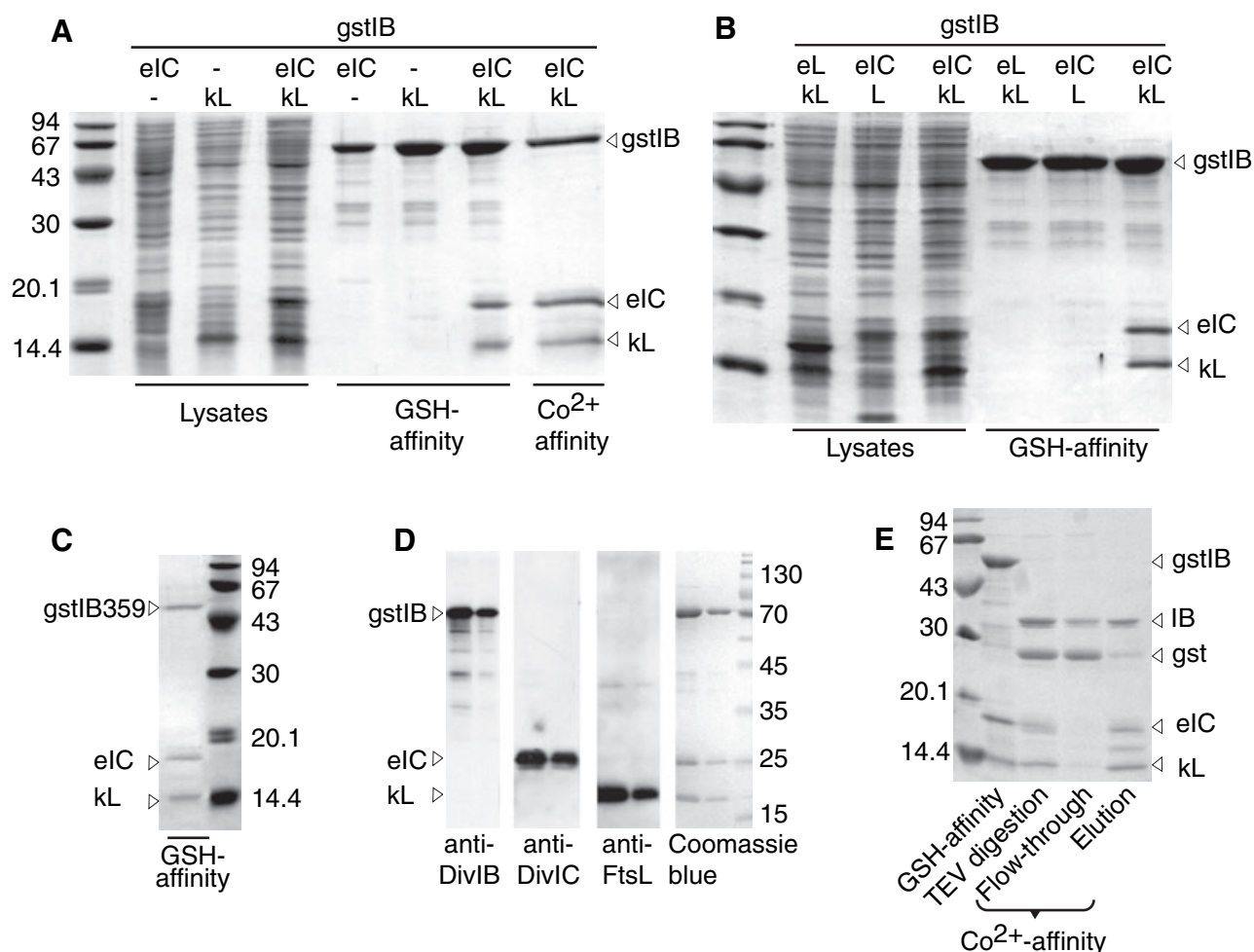
The interaction between gstIB and the eIC/kL dimer was demonstrated by copurification of the three recombinant proteins expressed separately in different strains that were mixed prior to cell disruption (Fig. 2A). The eIC and kL proteins were coeluted with gstIB from the glutathione-resin and gstIB was further copurified with the eIC/kL dimer following metal-affinity chromatography. The identity of each protein was confirmed by Western blotting (Fig. 2D) and their expected mass was measured by mass spectrometry (not shown).

The extracellular domain of FtsL and DivIC fused to the alternative e5- and k5-coils (i.e. eL and kIC) were similarly copurified with gstIB (not shown), but the yield was much

reduced because of the expression of kIC mostly in inclusion bodies. Purification of the ternary complex was also obtained following coexpression of the three proteins (not shown).

Neither eIC nor kL alone were copurified with gstIB (Fig. 2A). That homodimers of the extracellular domain of FtsL and DivIC do not interact with the extracellular domain of DivIB was demonstrated by the failure to copurify eL/kL (Fig. 2B) or eIC/kIC dimers with gstIB. In this latter case, caution is warranted because of the poor solubility of kIC. These experiments also show that gstIB does not interact with the dimer of e5 and k5.

Omitting the fusion of k5 to the extracellular domain of FtsL did not result in copurification of a complex, indicating that dimerization of FtsL and DivIC is required for the



**Fig. 2.** The fusion proteins gstIB, eIC and kL form a ternary complex. Proteins were purified by glutathione-affinity chromatography from mixed lysates of *E. coli* cells expressing the *S. pneumoniae* fusion proteins separately. Where indicated, further purification of obtained by metal-affinity chromatography.

A. Glutathione-affinity chromatography of gstIB in the presence of either or both eIC and kL.

B. Glutathione-affinity chromatography of gstIB in the presence of the homodimer eL/kL or both eIC and the extracellular domain of FtsL.

C. Glutathione-affinity chromatography of gstIB deleted of its 37 C-terminal residues in the presence of both eIC and kL.

D. Identification by Western blot of the proteins copurified by glutathione-affinity chromatography.

E. Metal-affinity chromatography following glutathione-affinity purification of gstIB/eIC/kL and cleavage of the gst moiety.



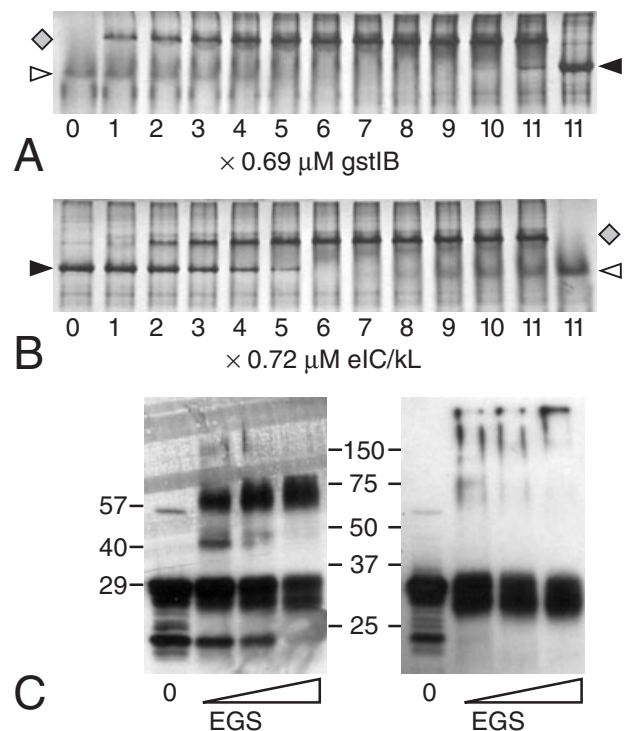
interaction with DivIB (Fig. 2B). The symmetrical experiment that is with the extracellular domain of DivIC without a coiled-coil extension was not carried out because of its expression mostly in inclusion bodies. When the *gst* moiety was removed from the *gstIB* fusion by a TEV protease digestion, the interaction between IB, eIC and kL was still detected by copurification by metal-affinity chromatography (Fig. 2E), demonstrating that the eIC/kL dimer interacts directly with the extracellular domain of DivIB. In this latter experiment, the digestion with the TEV protease generated some additional cleavage of IB resulting in an additional band of slightly lower molecular weight.

### Stoichiometry

Although the above experiments demonstrate that DivIB associate with DivIC and FtsL in an obligatory ternary complex, the assembly could involve either multiple IBs or eIC/kL dimers. To determine the stoichiometry of the *in vitro* complex, we carried out titration experiments monitored by non-denaturing gel electrophoresis. For that purpose, we separately purified *gstIB* and the eIC/kL dimer. As the monomers eIC or kL are both His-tagged and can be purified in the same way, care was taken to adjust the amount of both proteins (as judged by denaturing gel electrophoresis) in order to minimize the amount of excess monomeric eIC or kL.

A constant concentration of either eIC/kL dimer (7.2  $\mu$ M, Fig. 3A) or *gstIB* (3.4  $\mu$ M, Fig. 3B) was incubated with increasing concentrations of the interacting partner (0.69  $\mu$ M increments of *gstIB*, Figs 3A and 0.72  $\mu$ M increments of eIC/kL dimer, Fig. 3B). In our electrophoretic system, eIC/kL had a mobility slightly greater than *gstIB*, whereas the complex had the lowest mobility. The free titrated molecule disappears with increasing amounts of the titrating partner, while the amount of complex increases to reach a plateau. The titrating partner, then in excess, becomes visible. Band intensities for the titration of *gstIB* by eIC/kL were measured. For the amount of complex, a linear fit was applied to the first four data points, whereas a constant was fitted to the six data points of the plateau. The two lines intersect at a concentration of 3.6  $\mu$ M of eIC/kL, corresponding to a stoichiometry of 1.1 mole of eIC/kL per mole of *gstIB*. The data of the titration of eIC/kL by *gstIB* (Fig. 3A) did not allow reliable quantification. However, the excess of *gstIB* becomes detectable in lane 10, indicating a titration point between 6.2 and 6.9  $\mu$ M of *gstIB*. The intermediate concentration of 6.5  $\mu$ M of *gstIB* corresponds to a stoichiometry of 0.9 mole of eIC/kL per mole of *gstIB*.

A cross-linking experiment was performed with the IB/eIC/kL complex following trombin cleavage and removal of the *gst* moiety by glutathione affinity. Analysis by Western blot after denaturing gel electrophoresis showed addi-



**Fig. 3.** Stoichiometry of the ternary complex IB/eIC/kL.

A. Titration of 7.2  $\mu$ M of eIC/kL dimer (white arrow) with increasing amounts of *gstIB* (black arrow) by increments of 0.69  $\mu$ M to form the complex (grey diamond), monitored by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

B. Titration of 3.4  $\mu$ M of *gstIB* with increasing amounts of eIC/kL dimer by increments of 0.72  $\mu$ M.

C. Chemical cross-linking of the IB/eIC/kL complex (left panel) or IB alone (right panel) with EGS. Samples were analysed by Western blot with antibodies against DivIB following denaturing electrophoresis. Molecular weight standards (kDa) are given in the middle and molecular weights derived from the distance of migration are given on the left.

tional bands of cross-linked products corresponding to the IB/eIC or IB/kL covalent-adduct (40 kDa) and to the trimer (57 kDa) (Fig. 3C). These additional bands were absent in a control experiment omitting the eIC/kL dimer. We conclude from these results that the IB/eIC/kL *in vitro* complex has a 1:1:1 stoichiometry.

### The C-terminal tail of DivIB is not involved in the interaction with kL and eIC

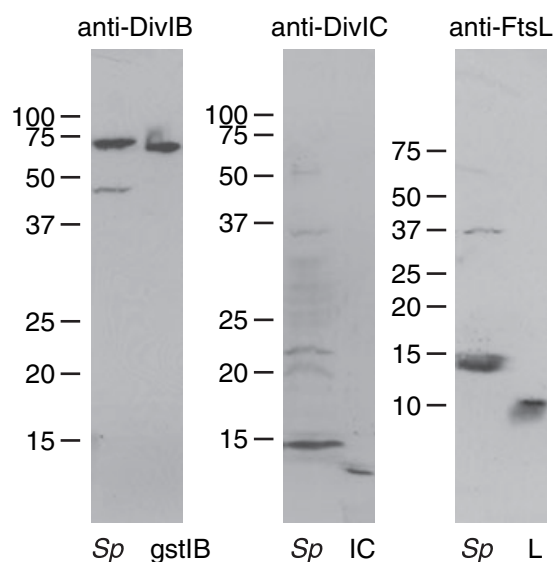
Examination of the DivIB and FtsQ sequences from various organisms by hydrophobic cluster analysis (Lemesle-Varloot *et al.*, 1990) revealed that the extracellular domain consists of a likely globular domain of about 200 amino acids, corresponding to the region of highest similarity. This globular domain is followed by a C-terminal tail of various length, probably unstructured, containing mostly polar and charged residues (*Supplementary material*, Fig. S2). This tail is approximately 37 residues long in *S.*

*pneumoniae*, 12 residues long in *B. subtilis* and 17 residues long in *E. coli*. It has been found that the last 29 amino acids of FtsQ from *E. coli* are required for the recruitment of other cell division proteins, such as FtsL, to the septum (Chen *et al.*, 2002), suggesting that the C-terminal tail of FtsQ may interact with FtsL. The copurification of a fusion of the extracellular domain of DivIB deleted of its last 37 amino acids (gstQ359) with the eIC/kL dimer (Fig. 2C) indicates that the C-terminal tail of pneumococcal DivIB is not required for interacting with DivIC and FtsL. The yield was reduced because gstIB359 was mostly expressed in inclusion bodies, indicating that the highly charged tail favours the solubility of the recombinant protein.

*DivIB, FtsL and DivIC are co-localized only during septation*

Previous works have established the following chain of events in the growth and division of *S. pneumoniae* (Morlot *et al.*, 2003; 2004). FtsZ, FtsW and all the penicillin-binding proteins (PBPs) are co-localized at mid-cell for close to half the generation time, presumably during chromosomal replication. The mid-cell of *S. pneumoniae* is marked by an equatorial outgrowth of cell wall. As the nucleoids start to segregate, the equatorial ring is duplicated and the two new rings mark the limits between a central region of new peptidoglycan and the old parental hemispheres. A subset of PBPs is linked to the duplicated equatorial rings and synthesizes the cylinder of new peripheral cell wall towards mid-cell. Meanwhile at mid-cell, constriction of the ring of FtsZ starts sometime before that of FtsW and the septal PBPs, which synthesize the septum of peptidoglycan outwardly. Finally, the relocation of FtsZ to the future division sites of the daughter cells occurs before that of FtsW and the septal PBPs.

The localization of DivIB, FtsL, DivIC and FtsZ during the cell cycle of *S. pneumoniae* was determined by various combinations of double immuno-labelling, together with DNA staining. Immunoblotting of the complex showed no cross-reactivity of the antibodies against recombinant DivIB, DivIC and FtsL (Fig. 2D), and preimmune sera gave no signal in immunofluorescence microscopy. Immunoblotting of pneumococcal total extract showed that the purified rabbit anti-DivIB antiserum reveals two bands (Fig. 4) that both consist of DivIB, as shown by mass spectrometry analysis following immunopurification and in-gel tryptic digestion (A. Zapun and S. Kieffer, unpublished result). The lower band may be a degradation product. The low mobility in SDS-PAGE of pneumococcal DivIB, which exhibits an apparent molecular mass of about 70 kDa, may be attributed to the two long stretches of charged and polar residues (1–127 in the cytoplasmic domain and 359–399 at the C-terminus).

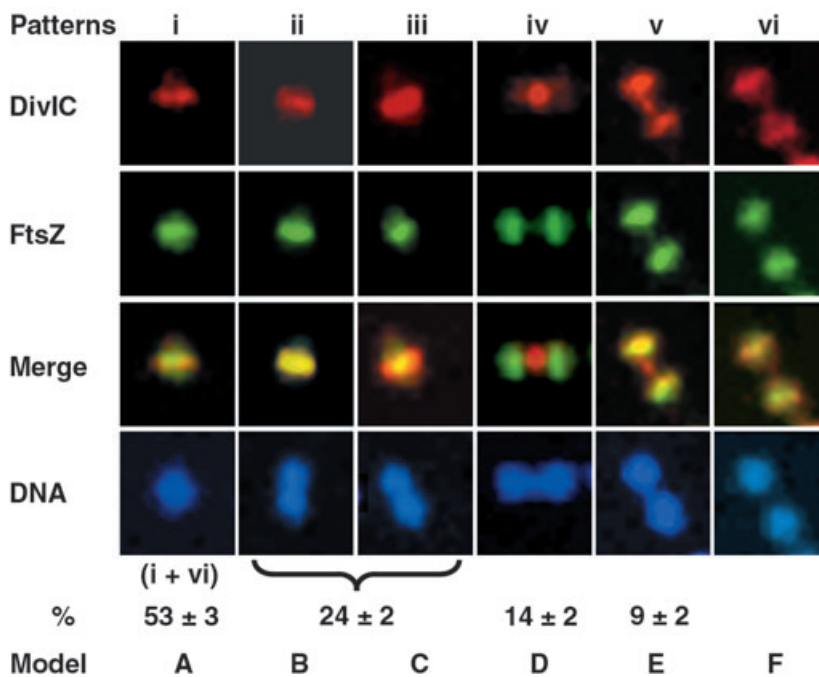


**Fig. 4.** Western blot of total extract of exponentially growing *S. pneumoniae* (Sp) revealed with the antibodies used for immunofluorescence studies. IC and L designate the His-tagged extracellular domains of DivIC and FtsL, respectively.

In contrast to the anti-DivIB antibodies, immunoblotting of total cellular extract with the mouse anti-DivIC antiserum and the purified rabbit anti-FtsL antiserum both revealed weak bands that are probably non-specific (Fig. 4). In the case of DivIC, the localization patterns are undoubtedly those of a division protein, being similar to those of FtsW and PBP2x (see below). If the immunofluorescent signal obtained using anti-DivIC antibodies were attributed to the cross-reacting proteins, these latter should also be division proteins. Although possible, this proposition is unlikely given the small number of such proteins encoded by the genome (about 0.5%). In the case of FtsL, the cross-reacting protein is of some concern, as the immunofluorescence patterns are rather unexpected (see below). With this notes of caution, we report the following immunofluorescence data for the localization of DivIC, DivIB and FtsL.

Comparison with the fluorescence patterns previously observed with FtsZ, FtsW and the penicillin-binding proteins that synthesize the cell wall (Morlot *et al.*, 2003; 2004), allowed the sorting of the patterns obtained with DivIB, FtsL and DivIC in a logical order corresponding to the progression through the cell cycle. The labelling of DivIC always appeared as bands or dots, interpreted as annular distribution of various sizes seen side-ways, always found at mid-cell (Fig. 5). The localization of DivIC is unchanged while the nucleoids segregate and the ring of FtsZ starts its constriction (Fig. 5ii and iii). In Fig. 5iv, the labelling of DivIC shows a dot, indicating that constriction of the annular distribution of DivIC is nearly complete, whereas FtsZ is already largely localized at the future





**Fig. 5.** FtsB in *S. pneumoniae* displays septal localization patterns. Cells were stained for DNA (blue), DivIC (red) and FtsZ (green). Images (i to vi) were arranged to represent progression through the cell cycle. The proportion of cells assigned to each immunofluorescence pattern is given below. The error is the standard error on the proportion. The number of cells with a recognizable pattern (N) was 355. An additional 18 cells had ill-defined patterns that could not be attributed to any class. The A to F nomenclature refer to the model proposed in Fig. 8.

division site of the daughter cells. Finally, DivIC is also relocalized with FtsZ at the equator of the daughter cells (Fig. 5v and vi). The localization of DivIC throughout the cell cycle and the relative amount of each protein pattern appears similar to that of FtsW and the penicillin-binding-proteins involved in the synthesis of septal peptidoglycan PBP2x and PBP1a (Morlot *et al.*, 2003; 2004). Some labelling of DivIC is sometimes observed at one of the poles of isolated cells, as previously observed with FtsW (Morlot *et al.*, 2004).

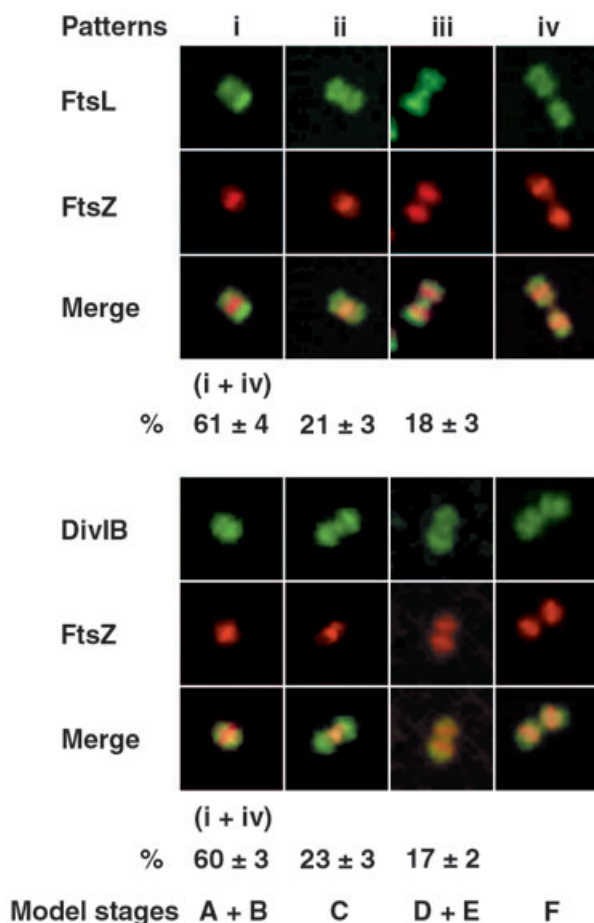
The labelling patterns observed for DivIB and FtsL are identical throughout the cell cycle. Surprisingly, in isolated cells or in diplococci not undergoing division (Fig. 6i and iv), DivIB and FtsL labelling is present on both hemispheres, but is apparently absent at mid-cell (Fig. 6i). The presence of DivIB and FtsL labelling on the parental hemispheres persists during the whole cell cycle. When constriction of the FtsZ ring is observed, some labelling of DivIB and FtsL is also present at mid-cell (Fig. 6ii). In Fig. 6iii, a dot of DivIB and FtsL labelling is observed at the septum while FtsZ is already relocalized at the equator of the daughter cells. In Fig. 6iii, the non-superposition of the fluorescence pattern of DivIB or FtsL with that of FtsZ demonstrates that DivIB and FtsL labelling is present on the old hemispheres rather than at the future division sites. Finally, in Fig. 6iv, DivIB and FtsL labelling is relocalized on both hemispheres and is absent at mid-cell. In a few instances, no DivIB or FtsL labelling was observed between two FtsZ rings. These patterns might represent a short-lived stage between those represented by Fig. 6iii and iv, when DivIB and FtsL are no more

present at the completed septum, while labelling of the new hemisphere is not yet established. Given the rarity of the cells with these patterns, they were considered as undetermined for the counting (*Supplementary material*, Fig. S3).

Colabelling of DivIB or FtsL with DivIC and DNA confirmed the localizations observed independently with FtsZ. The pattern shown in Fig. 7i is similar to those obtained with FtsZ immuno-labelling, showing a localization of DivIC at mid-cell. In the next staining pattern (Fig. 7ii), DivIB and FtsL are partially localized at mid-cell together with DivIC. In Fig. 7iii, DivIB and FtsL labelling is relocalized on both hemispheres but not at mid-cell. The localizations of DivIB, FtsL, DivIC and FtsZ, according to the various observed fluorescence patterns are summarized in Fig. 8.

#### Quantification of native proteins

The surprising labelling of the mature hemispheres with antisera directed against DivIB and FtsL prompted us to determine the amount of these two proteins in respect to DivIC, in exponentially growing *S. pneumoniae*. For comparison, we also determined the amount of PBP2x and PBP2b, two enzymes involved in septal and peripheral peptidoglycan synthesis, respectively (Morlot *et al.*, 2003). Results are given in Table 1. The striking finding is the 10-fold excess of DivIC over DivIB and FtsL, which are present in similar amounts. These data are consistent with a model where DivIB and FtsL have similar cellular fates, different from that of DivIC. The number of molecules of

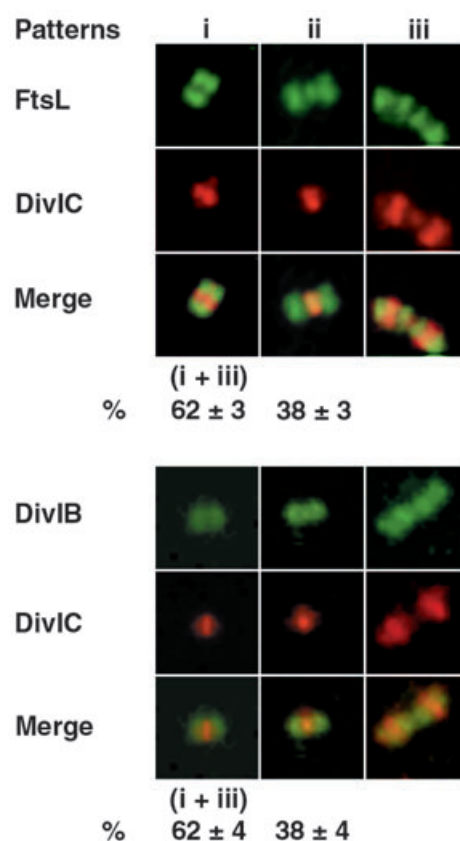


**Fig. 6.** localization of DivIB or FtsL. Cells were stained for DivIB or FtsL (green) and FtsZ (red). Images (i to iv) were arranged to represent progression through the cell cycle. The proportion of cells assigned to each immunofluorescence pattern is given below. The error is the standard error on the proportion. The number of cells with a recognizable pattern (N) was 227 for DivIB/FtsZ and 188 for FtsL/FtsZ. The number of cells with ill-defined patterns that could not be attributed to any class was 121 for DivIB/FtsZ and 25 for FtsL/FtsZ. The A to F nomenclature refer to the model proposed in Fig. 8.

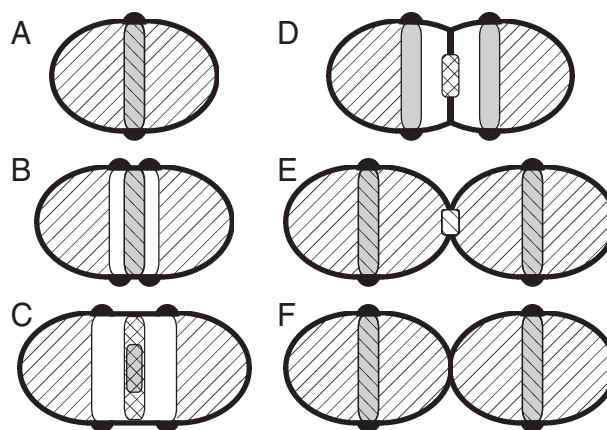
DivIB and FtsL are in the same order as that of the two PBPs that were quantified. It is interesting to note that PBP2b is twice as abundant as PBP2x. The greater number of PBP2b molecules may be related to the peripheral cell wall synthesis occurring at two parting rings, whereas a single apparent ring of PBP2x participates to the septal synthesis.

## Discussion

The *in vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, FtsL and DivIC demonstrates for the first time the physical interaction that was suggested by genetic and localization results. The association of DivIC and FtsL appears to be necessary for their interaction with DivIB, in accordance with the corecruitment of these two proteins to the division



**Fig. 7.** Immunolocalization of DivIB or FtsL with DivIC. Cells were stained for DivIB or FtsL (green) and DivIC (red). The proportion of cells assigned to each pattern is given below. The error is the standard error on the proportion. The number of cells with a recognizable pattern (N) was 125 for DivIB/DivIC and 263 for FtsL/DivIC. The number of cells with ill-defined patterns that could not be attributed to any class was 52 for DivIB/DivIC and 130 for FtsL/DivIC.



**Fig. 8.** Interpretation of the immunofluorescence patterns of DivIB, DivIC, FtsL and FtsZ from this work and FtsW and the high molecular weight PBPs from previous work (Morlot *et al.*, 2003; 2004). Right-leaning hatches indicate the presence of DivIB and FtsL, left-leaning hatches that of DivIC, FtsW and septal PBPs. Non-septal PBPs follow the localization of the duplicated equatorial rings depicted as black bumps of peptidoglycan. The localization of FtsZ is grey-shaded.

**Table 1.** Quantification of some division and cell wall synthesis proteins in *S. pneumoniae*.

Protein	DivIC	DivIB	FtsL	PBP2x	PBP2b
Molecules/cfu <sup>a</sup>	1800 ± 200	200 ± 40	150 ± 60	260 ± 60	720 ± 180

a. The number of cfus per ml of culture per unit of optical density at 600 nm was determined to be  $(1.6 \pm 0.1) \times 10^9$ .

site of *B. subtilis* (Daniel *et al.*, 1998; Daniel and Errington, 2000; Katis *et al.*, 2000).

That the extracellular domain of DivIB is sufficient to form a complex with a DivIC/FtsL dimer *in vitro*, confirms the role of this domain for the function and localization of DivIB or FtsQ (Guzman *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Katis and Wake, 1999; Katis *et al.*, 2000). The highly charged C-terminal tail of DivIB from *S. pneumoniae* is not required for the formation of the complex. This result indicates that the loss of function of *E. coli* FtsQ upon deletion of its last 29 C-terminal amino acids (Chen *et al.*, 2002) is not attributed to the absence of the highly polar tail, which is only 17 residues long in *E. coli*, but to truncation of the core domain.

DivIB, DivIC and FtsL appear to be co-localized at the division site of *S. pneumoniae* only during septation, although they seem to be present in the cell throughout the cell cycle. Thus, formation of the trimeric complex is likely a controlled event. DivIB and FtsL are probably recruited to the septum via the interaction of FtsL with DivIC, the latter being always localized at the division site. The fact that the extracellular domains of DivIB, DivIC and FtsL contain the structural information necessary for their mutual recognition, but that the association of the latter needs to be constrained *in vitro* by the addition of dimerization domains, suggests that the formation of the complex *in vivo* is controlled at the level of the transmembrane segments and/or cytoplasmic regions of DivIC and FtsL.

The main finding of our localization study is the presence of DivIB, FtsL and DivIC together at the division site only during a short phase that appears to be the synthesis of septal peptidoglycan. If we integrate all the localization data of high molecular weight PBPs and division proteins in *S. pneumoniae* from this and previous works (Morlot *et al.*, 2003; 2004), the following chain of events can be proposed and is presented in Fig. 8. For close to half the generation time, FtsZ, DivIC, FtsW and all the high molecular weight PBPs are co-localized at the equator, whereas DivIB and FtsL are absent at mid-cell (Fig. 8A and F). When the nucleoids starts to segregate, the cell wall equatorial ring is duplicated and new peripheral peptidoglycan is synthesized by the PBPs that remain localized with the two new equatorial rings. At this point, FtsZ, DivIC, FtsW and the septal PBPs remain at mid-cell, without DivIB and FtsL (Fig. 8B). The ring of FtsZ constricts, but the localization of DivIC, FtsW and the septal PBPs is unchanged (Fig. 8C). DivIB and FtsL now join the division

site. The apparent rings of DivIB, FtsL, DivIC, FtsW and the septal PBPs constrict together. FtsZ is relocated to the future division sites of the daughter cells, while the ring constriction of DivIB, FtsL, DivIC, FtsW and the septal PBPs proceeds (Fig. 8D). DivIC, FtsW and the septal PBPs are finally relocated at the equators of the new cells with FtsZ and the other high molecular weight PBPs, while some remain at the closing septum (or new poles) (Fig. 8E).

Thus, DivIB, FtsL, appear to be co-localized with DivIC, FtsW and the septal PBPs during synthesis of the septum, suggesting that the function of DivIB, FtsL and DivIC may be related to septal peptidoglycan synthesis. This relationship with the cell wall would be consistent with the greater amount of DivIB in the Gram-positive *B. subtilis* and *S. pneumoniae* than FtsQ in the Gram-negative *E. coli*, which have a thick and thin cell wall, respectively (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). We propose that the trimeric complex may regulate the enzymatic machinery that synthesizes the septal cell wall. All the required enzymes, FtsW and the dedicated PBPs, are already in place long before septation occurs. The recruitment of FtsL and DivIB by DivIC would trigger septal peptidoglycan synthesis. As the septal disc is built starting from its periphery, the amount of necessary peptidoglycan synthesis diminishes progressively until it vanishes when the septum is completed at its centre. This decreasing activity of the enzymatic machinery could result from the proteolytic degradation of one or more constituents of the activating complex DivIB/FtsL/DivIC (Daniel *et al.*, 1998; Daniel and Errington, 2000; Buddelmeijer *et al.*, 2002).

The above interpretations and hypotheses leave out a striking feature of the immunofluorescence data, which is the constant presence of DivIB and FtsL labelling on the parental hemispheres of the dividing cell. If formation of the trimeric complex is to activate septal cell wall synthesis, it must be a rapid event that requires that all the components be already present in the cell. Thus, DivIB and FtsL may be synthesized and stored on both hemispheres for the next division, and the excess may remain on the parental hemispheres after the division event. This explanation, however, is not supported by the measured amounts of cellular DivIB, DivIC and FtsL. Indeed, DivIC appears to be in 10-fold excess over its two partners, DivIB and FtsL that are present in low abundance. The amount of DivIC, DivIB and FtsL proteins in a growing culture of *S. pneumoniae* is more consistent with a model

where DivIC is always present at the division site, whereas DivIB and FtsL are only transiently present in the cell during septation, being rapidly synthesized and degraded. Alternatively, DivIB and FtsL may always be present in the cell but only transiently concentrated at the septum.

With these two latter hypotheses, the labelling observed on the parental hemispheres with the rabbit antisera against DivIB and FtsL would be non-specific. This immunofluorescent signal might not necessarily result from cross-reacting proteins. Indeed, the anti-DivIB antibodies do not exhibit cross-reactivity by immunoblotting of pneumococcal total extract. Other macromolecules such as polysaccharides may give rise to antibodies that would be silent in immunoblotting but reveal bacterial surfaces. In this respect, it is noteworthy that the complete Freund's adjuvant that is administered to the rabbits together with the antigens contains 1 mg ml<sup>-1</sup> of dried *Mycobacterium tuberculosis*. The nature of the immuno-labelling on the hemisphere awaits further investigation.

In summary, we have demonstrated by *in vitro* reconstitution that the extracellular domains of DivIB, DivIC and FtsL contain the structural information required for the recognition of DivIC and FtsL by DivIB, provided that the extracellular domains of DivIC and FtsL are held in close proximity. In *S. pneumoniae in vivo*, DivIC, which is in 10-fold excess over DivIB and FtsL, is always present at the division site, like FtsW, PBP2x and PBP1a, whereas DivIB and FtsL are observed at the division site only during septation. A major difference between streptococci and bacilli is that the former have their division site well defined throughout the cell cycle with part of the machinery pre-assembled and waiting for a trigger, whereas the division site of bacilli disappears during the elongation phase and the whole machinery needs to be assembled shortly before septation. A detailed understanding of bacterial division and morphogenesis will only arise from further comparisons of several model organisms with varied morphologies.

## Experimental procedures

### Plasmids construction

*Streptococcus pneumoniae* R6 was used for PCR amplification of the *divIB*, *ftsL* and *divIC* genes. The sequences encoding the extracellular domain of DivIB, i.e. IB (residues S153-R396) or IB359 (residues S153-E359) were amplified with the primer CATGGGATCCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCAGTCCTTATGCGACCATGAAAG which encodes a TEV protease recognition site, and the primers CATGGAATTCGCTAGCCTAGCGACGCGATGAACGC for IB and CATGGAATTCGCTAGCCTAGCCTAGCCTTCCATAATTAATTTATCC for IB359, respectively. PCR products were introduced as *Bam*HI-*Eco*RI fragments into pGEX-4T1 (Amersham) resulting in pGEX-gstIB or pGEX-gstIB359. The *gstIB* gene fusion

was amplified from pGEX-gstIB with the AGGAAACAGTATCATGGGTTCCCCTATACTAGGT and CATGGAATTCGCTAGCCTAGCGACGCGATGAACGC primers and introduced as a *Nco*I-*Eco*RI fragment into pETduet (Novagen) generating pET-gstIB.

The sequences encoding the e5 and k5 polypeptides were amplified from pGemT/e5 and pGemT/k5, respectively (kindly provided by G. De Crescenzo, Mc Gill University, Montreal) with the primers CGCGGATCCCATATGCATCACCATCACCATCACGGTGGCGAGGTATCCGCT and CCGCTC GAGCGGCTAAGCGCTTACTTCTTTTCCAAGGCTGACA CCTCTTT for e5, and CGCGGATCCCATATGCATCACCATC ACCATCACGGTGGCAAGGTATCCGCT and CCGCTCGAG CGGCTAAGCGCTAACCTTTTCTTCAAGGCTGACACCT CTC for k5, to introduce a N-terminal His-tag. PCR products were introduced as *Bam*HI-*Xho*I fragments into pCR-script (Stratagene) giving rise to pPCR-e and pPCR-k.

The sequences coding for the extracellular domain of FtsL (L, residues M44-E105) and DivIC (IC, residues S55-R122), were amplified with primers GATGCTACCATATGCATCATCATCATCATAGCGCTATGCAGACCAAGCTCTTGC and CATCCTCGAGACTAGTTACTCCGCTATTCGAATATTTTC for the L protein and GATGCTACCATATGCATCATCATCATCATCATAGCGCTAGTTATCAGCAATTACTCC and CATCCTCGAG ACTAGTTACCTTTGAAGCAAGTCAGG for the IC protein. PCR products were introduced as *Nde*I-*Xho*I fragments into pET30b (Novagen) to yield pET30-L and pET30-IC. *Eco*47III-*Xho*I fragments were then subcloned into pPCR-k or pPCR-e predigested with *Eco*47III-*Xho*I, to generate pPCR-kL and pPCR-eIC, respectively. The fusion genes were finally subcloned into pETduet (Novagen) as a *Nde*I-*Xho*I fragments, resulting in pET-kL and pET-eIC.

For coexpression of the three proteins, the *Nde*I-*Xho*I fragment encoding eIC was introduced into pACYCduet (Novagen), and the sequence encoding the fusion gstIB was PCR amplified from pGEX-gstIB and introduced as a *Nco*I-*Eco*RI fragment into pET-kL.

### Production of recombinant proteins and complexes

Proteins were expressed individually in *E. coli* BL21 (DE3). GstIB and gstIB359 are fusion proteins with the glutathione-S-transferase tag and contain TEV protease and thrombin cleavage sites. The eL, kL, L, eIC, kIC proteins were expressed with an amino-terminal His-tag. Expression was induced with 1 mM IPTG for 3 h at 37°C. Cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, with protease inhibitors (Complete, Roche), and mixed prior to sonication. Lysates were loaded onto a 2 ml glutathione-Sepharose 4B column (Amersham) equilibrated in the same buffer. Elution was performed with 10 mM reduced glutathione. The fractions of interest were supplemented with NaCl to 500 mM and loaded onto a 2 ml Co<sup>2+</sup>-loaded column (Talon, Invitrogen) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole. Elution was with 200 mM imidazole in the above buffer. The IB/eIC/kL complex was prepared as described above for gstIB/eIC/kL except for the addition of a digestion step by the TEV protease (Invitrogen) or bovine thrombin (Sigma) between the two chromatography steps. Glutathione was removed by dialysis and the cleaved gst moiety by glutathione-affinity. The first or second



chromatography was omitted when only His- or gst-tagged proteins were prepared, respectively. IB was prepared by thrombin digestion of gstIB purified by glutathione-affinity chromatography.

### Titration

Equivalent amounts of cells expressing either eIC or kL were mixed prior to cell disruption and the proteins were purified together by Co<sup>2+</sup>-affinity chromatography. As both eIC and kL are His-tagged, an excess of either protein would be copurified along with the eIC/kL dimer. However, as the expression levels were similar, there was no significant excess of monomeric eIC or kL after purification. Protein concentration was determined with the Bio-Rad protein assay. Appropriate quantities of gstIB and eIC/kL were incubated together at room temperature for 10 min prior to analysis by non-denaturing gel electrophoresis with the classical Ornstein-Davis system (Davis, 1964).

### Cross-linking

The buffer was finally exchanged for phosphate buffered saline by desalting on a G25 resin. About 0.5 µM of IB/eIC/kL or IB were incubated for 20 min with 0, 50, 250, 1250 µM of EGS (Pierce). Samples were analysed by Western blot following denaturing gel electrophoresis.

### Antibodies and immunofluorescence microscopy

Rabbit antisera (DivIB and FtsL) or mouse antiserum (DivIC) were raised against the recombinant extracellular portion of the proteins. Antibodies were purified by affinity chromatography using the antigens coupled to activated CH sepharose 4B (Amersham). Immunofluorescence staining was performed and analysed as described previously (Morlot *et al.*, 2003).

### Quantification

Cells grown in glucose buffered broth to an optical density at 600 nm of 0.4 or 0.5 were lysed by resuspension and incubation in one-tenth volume of CelLytic™ BII solution (Sigma) containing hen egg lysozyme (Sigma, 10 kU ml<sup>-1</sup>) for 15 min at room temperature. After addition of SDS-PAGE loading buffer and heating for 5 min at 95°C, aliquots were stored at -20°C. Serial dilutions of the extracts were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting, together with varying known amounts of recombinant protein standards. The standards were gstIB, His-tagged L (residues M44-E105), His-tagged IC (residues S55-R122), the extracellular domains of PBP2x (residues 49–750) and PBP2b (residues 35–680). The concentration of the standards were determined by the absorbance at 280 nm for gstIB, PBP2x and PBP2b, and amino acid analysis for His-tagged L and His-tagged IC. The membranes were of nitrocellulose 0.2 µm, and transfer was at 360 mA for 1 h. The juxtaposition of a second membrane allowed to check that no proteins were crossing the first membrane, and Coomassie staining of the gel that transfer

was efficient. After revelation using ECL™ reagents (Amersham), bands were quantified with the Quantity One software (Bio-Rad)

### Acknowledgements

We thank G. De Crescenzo for discussions about the e5 and k5 peptides and for plasmids, I. Attree-Delic for access to the fluorescence microscope, P. Méresse (Hybrislère, Grenoble) for the mouse antisera, S. Kieffer for mass spectrometry analysis, J.-P. Andrieux for amino acid analysis and A. Desse for critical comments. M. N.-S. and C. M. were supported by postdoctoral and CFR fellowships from CEA, respectively. This work was partially funded by the 6th European Framework Program (COBRA LSHM-CT-2003–503335).

### Supplementary material

The following material is available from

<http://www.blackwellpublishing.com/products/journals/mmi/mmi4408/mmi4408sm.htm>

**Fig. S1.** Amino acid pattern in PROSITE syntax that can be used to retrieve DivTC homologues using the program PATTINPROT.

**Fig. S2.** Hydrophobic cluster analysis (HCA) plots of *S. pneumoniae* and *B. subtilis* DivIB and *E. coli* FtsQ.

**Fig. S3.** Field of pneumococcal cells immunolabelled for DivIB (green) and FtsZ (red).

### References

- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195–205.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr Opin Microbiol* **5**: 553–557.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2004) A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* **52**: 1315–1327.
- Buddelmeijer, N., Judson, N., Boyd, D., Mekalanos, J.J., and Beckwith, J. (2002) YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6316–6321.
- Chao, H., Houston, M.E., Jr, Grothe, S., Kay, C.M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R.T., and Hodges, R.S. (1996) Kinetic study on the formation of a *de novo* designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. *Biochemistry* **35**: 12175–12185.
- Chen, J.C., Weiss, D.S., Ghigo, J.M., and Beckwith, J. (1999) Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 521–530.
- Chen, J.C., Mineev, M., and Beckwith, J. (2002) Analysis of ftsQ mutant alleles in *Escherichia coli*: complementation,

- septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *J Bacteriol* **184**: 695–705.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2000) Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol* **36**: 278–289.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G., and Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene ftsL(yllD) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* **29**: 593–604.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**: 404–427.
- Draper, G.C., McLennan, N., Begg, K., Masters, M., and Donachie, W.D. (1998) Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* **180**: 4621–4627.
- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 52–65.
- Ghigo, J.M., and Beckwith, J. (2000) Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J Bacteriol* **182**: 116–129.
- Ghigo, J.M., Weiss, D.S., Chen, J.C., Yarrow, J.C., and Beckwith, J. (1999) Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol Microbiol* **31**: 725–737.
- Guzman, L.M., Barondess, J.J., and Beckwith, J. (1992) FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 7716–7728.
- Guzman, L.M., Weiss, D.S., and Beckwith, J. (1997) Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 5094–5103.
- Katis, V.L., and Wake, R.G. (1999) Membrane-bound division proteins DivIB and DivIC of *Bacillus subtilis* function solely through their external domains in both vegetative and sporulation division. *J Bacteriol* **181**: 2710–2718.
- Katis, V.L., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2000) Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. *J Bacteriol* **182**: 3607–3611.
- Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A., and Mornon, J.P. (1990) Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* **72**: 555–574.
- Levin, P.A., and Losick, R. (1994) Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J Bacteriol* **176**: 1451–1459.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 375–382.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004) The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 1641–1648.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845–855.
- Pisabarro, A.G., Prats, R., Vaquez, D., and Rodriguez-Tebar, A. (1986) Activity of penicillin-binding protein 3 from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **168**: 199–206.
- Robson, S.A., Michie, K.A., Mackay, J.P., Harry, E., and King, G.F. (2002) The *Bacillus subtilis* cell division proteins FtsL and DivIC are intrinsically unstable and do not interact with one another in the absence of other septosomal components. *Mol Microbiol* **44**: 663–674.
- Sievers, J., and Errington, J. (2000) The *Bacillus subtilis* cell division protein FtsL localizes to sites of septation and interacts with DivIC. *Mol Microbiol* **36**: 846–855.

## MATERIEL ET METHODES

Des cellules de *S. pneumoniae* de souche R6 ont été cultivées dans 15 ml de Bouillon Glucosé Tamponné jusqu'à une DO comprise entre 0,4 et 0,5, puis lysées (2 ml de culture) par addition de 200 µL de tampon de lyse (Cell lytic buffer, Sigma) et de 2 µL de lysozyme (Sigma, 10 kU ml<sup>-1</sup>) pendant 15 minutes à température ambiante. Après addition de tampon de charge 1x final, les aliquots ont été chauffés 3 minutes à 100°C, avant congélation à -20°C. Ces lysats ont été décongelés et redénaturés 3 minutes à 100°C avant chargement sur gel de polyacrylamide 12,5%. Le transfert sur membrane PVDF Problott (Applied Biosystem) a été réalisé à 365 mA pendant 1 heure et demi dans une solution contenant du CAPS et du méthanol. La membrane a été saturée avec 80 ml de PBS, tween 20 0,3%, lait 5%, pendant 1 heure. La membrane a été incubée 1 heure avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-DivIB dilué au 1/5000, de souris anti-DivIC dilué au 1/1000, et de lapin anti-FtsL dilué au 1/2000, de lapin anti-PBP2x dilué au 1/40000 et de lapin anti-PBP2b dilué au 1/40000. Trois lavages de 15 minutes avec du PBS, tween 20 0,3%, ont été réalisés. Puis, l'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris ou lapin, couplé à la peroxydase, dilué au 1/10000, a été incubé 1 heure. Trois autres lavages de 15 minutes ont été effectués avec du PBS, tween 20 0,3%. La révélation a été faite par chimioluminescence après dépôt sur la membrane d'un mélange de 500 µl de chacun des réactifs du kit « ECL Western Blotting detection reagents » (Amersham Biosciences). La membrane PVDF a été exposée contre un film (Hyperfilm™, Amersham Biosciences) qui a été développé. L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide d'un appareil « Gel doc » et du logiciel Quantity One (BioRad).

## RESULTATS ET DISCUSSION

La quantification des molécules peut fournir des données intéressantes permettant de contraindre des modèles théoriques. Nous avons donc souhaité quantifier les protéines DivIB, DivIC, FtsL, ainsi que les deux PBPs HMW de classe B, PBP2x et PBP2b, de *S. pneumoniae*. Pour quantifier le nombre de molécules d'une protéine donnée par cellule, il existe plusieurs techniques comme, par exemple, le test ELISA et le western Blot. Nous avons choisi d'utiliser cette dernière technique car le Western Blot quantitatif a déjà été utilisé pour quantifier des protéines de la division bactérienne comme FtsZ. Une recherche bibliographique nous a alerté sur la difficulté de cette méthode. Les valeurs obtenues par Western blot pour la protéine FtsZ dans *E. coli* varient de 3200 à 15000 molécules/cellule (161, 200, 217). Ceci nous a incité à

être particulièrement rigoureux et vigilant lors de la mise au point de notre western blot quantitatif.

Dans un premier temps, nous avons préparé des échantillons standards en déterminant les concentrations des stocks des protéines recombinantes solubles DivIB\* (S150-R396), DivIC\* (S55-R122), FtsL\* (Q45-E105), PBP2x\* (G49-D750) et PBP2b\* (G34-N685) par le test de Bradford (Biorad) (23). Les premiers transferts des protéines ont été réalisés sur des membranes de nitrocellulose de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ . La coloration du gel de polyacrylamide au bleu de Coomassie après transfert de 1 heure à 100 volts a montré que le transfert n'était pas complet. Le temps de transfert a donc été augmenté tout en plaçant deux membranes de nitrocellulose juxtaposées pour contrôler un éventuel passage des protéines à travers la première membrane. Or, il s'est avéré que non seulement, une partie des protéines passaient sur la seconde membrane, mais de plus, qu'il y avait une différence d'efficacité de transfert entre les protéines recombinantes et les protéines endogènes. Pour résoudre ces problèmes, nous avons utilisé une membrane de type PVDF de porosité 0,1  $\mu\text{m}$ . Nous avons alors pu augmenter le temps de transfert jusqu'à 1h30 sans que les protéines ne traversent la première membrane tout en s'assurant d'un transfert total des protéines du gel vers la membrane.

Après révélation de l'immunoblot par chemiluminescence, une photo numérisée du film a été prise et l'intensité des bandes a été quantifiée (Figure 26). Plusieurs dilutions de lysat de pneumocoque, ont été analysées en double afin de vérifier la proportionnalité et la reproductibilité des valeurs obtenues. Tous ces contrôles ont permis de déterminer l'écart type sur le nombre de molécules obtenu. Les gammes étalons de dilution des protéines recombinantes ont été ajustées pour pouvoir calculer la concentration des protéines présentes dans les lysats de pneumocoque. Elles ont permis d'établir une relation entre l'intensité des bandes mesurée et le nombre de moles de protéines.

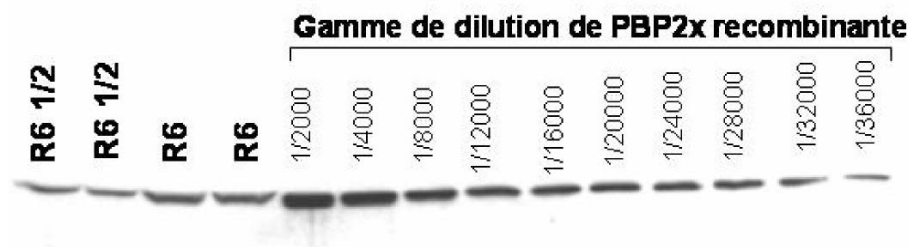


Figure 26. Quantification de PBP2x chez *S. pneumoniae* de souche R6 par Western blot. Dépôt sur gel de polyacrylamide 12,5% SDS de 10  $\mu\text{l}$  d'une gamme étalon de PBP2x (1,4 à 25 nM) et 10  $\mu\text{l}$  de culture de pneumocoque à DO = 0,5 (non dilué, dilué au 1/2). L'anticorps primaire polyclonal de souris anti-PBP2x était dilué au 1/40000. L'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris, couplé à la peroxydase était dilué au 1/5000. Révélation par chimioluminescence (kit ECL Western Blotting detection reagents, Amersham Biosciences).



Le nombre d'unité formant colonie (UFC) par ml (N) a été calculé à l'aide de la formule  $N = (1,6 \pm 0,1) \cdot 10^9 \times DO$ , reliant la densité optique de la culture aux nombres de UFC/ml. Cette relation a été établie en étalant sur boîte de gélose des aliquots de culture liquide à toutes les phases de croissance du pneumocoque et comptage des colonies. L'erreur sur le facteur de proportionnalité entre la turbidité et le nombre d'unité formant colonie n'est pas connue. *S. pneumoniae* étant un dicoque, il est possible qu'une erreur d'un facteur deux existe. Dans l'hypothèse la plus défavorable, il y aurait deux fois moins de molécules/cellule. Pour ces raisons, il n'est pas exclu que les valeurs absolues du nombre de molécules/cellule ne soient pas correctes. En revanche, le rapport des quantités des différentes protéines les unes par rapport aux autres semble fiable.

Tableau 4 : Nombre de molécules de DivIB, DivIC, FtsL, PBP2x et PBP2b par unité formant colonie (UFC) de *S. pneumoniae*.

Protéines	DivIB	DivIC	FtsL	PBP2x	PBP2b
Nb de molécules/UFC	$200 \pm 40$	$1800 \pm 200$	$150 \pm 60$	$260 \pm 60$	$720 \pm 180$

Le nombre de molécules/cellule de DivIB, FtsL, et PBP2x est comparable au nombre de protéines déterminé pour la plupart des protéines de la division (Tableau 4). PBP2b est environ trois fois plus abondante et DivIC est environ 10 fois plus abondante.

Les deux PBPs de *S. pneumoniae*, PBP2x et PBP2b, sont en quantité équivalente à leurs homologues chez *E. coli*, PBP3 et PBP2 (72). De manière intéressante, on trouve environ trois fois plus de PBP2b que de PBP2x par cellule. PBP2x, homologue de FtsI chez *E. coli* est probablement la PBP de classe B impliquée dans la synthèse septale. PBP2b pourrait être la PBP de classe B impliquée dans la synthèse périphérique. Ceci expliquerait que la cellule ait besoin de plus de PBP2b que de PBP2x (Figure 27). Ceci est toutefois spéculatif.

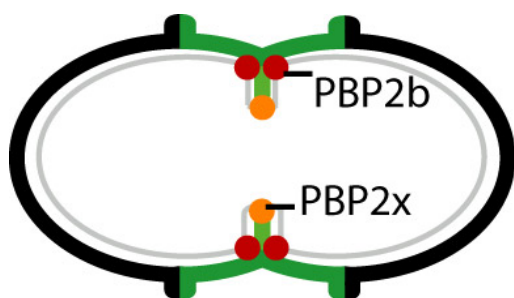


Figure 27. Modèle proposant pourquoi PBP2b est plus abondante que PBP2x chez le pneumocoque.

DivIB n'est pas très abondant, présent à environ 200 molécules/UFC alors que chez la bactérie à Gram positif *B. subtilis* sa quantité est estimée à 5000 molécules par cellule (216). Il a été suggéré que la différence d'abondance entre FtsQ d'*E. coli* (25-50 copies par cellule) (38) et DivIB de *B. subtilis* était reliée à la nécessité de fabriquer une paroi plus épaisse chez la bactérie à Gram positif *B. subtilis*. Au vu des données obtenues chez la bactérie à Gram positif *S. pneumoniae*, il semble que 200 molécules devraient suffir à fabriquer une paroi plus épaisse. De plus, chez *B. subtilis*, 2% des molécules (soit environ 100 molécules) suffisent à maintenir le processus de division végétative (216) alors que plus de 70% sont nécessaire à la sporulation (207). L'excès de DivIB chez *B. subtilis* est probablement nécessaire à sa sporulation. Tout comme DivIB, FtsL est peu abondante et présente dans le même ordre de grandeur que toutes les protéines de la division. Enfin, DivIC est dix fois plus abondante, présente à environ 2000 molécules/UFC. Ceci est cohérent avec les données de localisation, où FtsL et DivIB présente une localisation similaire différente de celle de DivIC (190). Par ailleurs, au vu de la quantité de DivIC présente dans la cellule, il est peu probable qu'elle soit limitante pour la formation du complexe ternaire.

1. DivIB de *S. pneumoniae* est peu abondante, environ 200 molécules/UFC. La différence d'abondance de FtsQ d'*E. coli* et DivIB de *B. subtilis* n'est pas à l'origine d'une synthèse d'une paroi plus épaisse. L'excès de DivIB chez *B. subtilis* est probablement relié à la sporulation.
2. PBP2b est deux fois plus abondante que PBP2x, enzyme de synthèse du PG septal. Il est possible qu'elle soit impliquée dans la synthèse du PG périphérique.
3. DivIC est une protéine 10 fois plus abondante que DivIB et FtsL et, par conséquent n'est pas limitante pour la formation du complexe ternaire.

# DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES D'INTERACTION DU COMPLEXE TERNAIRE PAR LA TECHNOLOGIE BIACORE®

## INTRODUCTION

### I. Principe du BIACORE®

Le système BIACORE® est un biocapteur utilisant le principe physique de la résonance plasmonique de surface (SPR) (171). Il permet de mesurer en temps réel, et sans marquage spécifique, les caractéristiques d'interaction entre deux molécules sur une surface biospécifique. Pour cela, une des molécules (Ligand) est immobilisée sur la surface de détection et l'autre (Analyte) est injectée dans la phase mobile. Le principe de détection par SPR quantifie des changements de l'indice de réfraction près de la surface, reliés à la variation de masse à la surface du biocapteur, due à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires. En effet, lorsqu'une lumière monochromatique et polarisée arrive à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, et que cette interface est recouverte d'une fine couche métallique, l'intensité de la lumière réfléchie est nettement réduite pour un angle d'incidence particulier (Figure 28). Ceci provient du fait qu'une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface, jusqu'à 1  $\mu\text{m}$ . L'angle de résonance varie notamment en fonction de l'indice de réfraction, donc en fonction de la masse des molécules situées au voisinage de la surface.

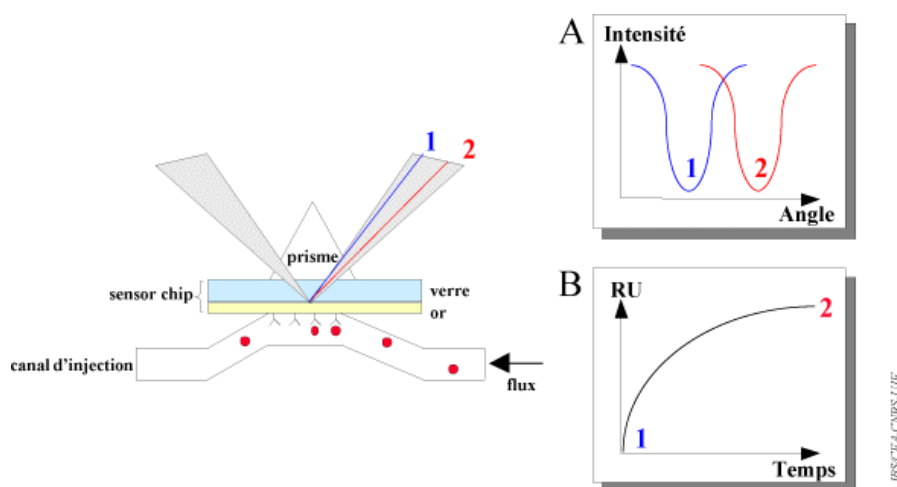


Figure 28. Principe de détection du système BIACORE®. A, chute d'intensité dans le faisceau de lumière réfléchi en fonction de l'angle. B, variation de la valeur de l'angle de résonance en fonction du temps (sensorgramme).

Un suivi de l'angle SPR en fonction du temps permet de suivre en temps réel l'association et la dissociation entre le ligand et l'analyte. Le signal enregistré donne un sensorgramme (Figure 28B) sur lequel on observe la variation d'unités de résonance (RU) au cours du temps. Une variation de 1000 RU correspond à un déplacement de l'angle de  $0.1^\circ$  et équivaut à une fixation de 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$ .

## II. Les puces de détection NTA

La surface classiquement utilisée pour les expériences (Surface de détection CM5) est constituée d'un support de verre recouvert d'un film d'or de 50 nm, sur lequel est fixée une matrice de dextran de 100 nm d'épaisseur. Cette matrice est un gel non réticulé hydrophile, permettant l'immobilisation covalente de ligands par l'intermédiaire de groupements carboxyles. D'autres surfaces dérivées de la surface CM5 sont disponibles (<http://www.biacore.com/products/chips/chips.html>) pour des applications particulières. Nous avons utilisé la surface NTA qui comporte des groupements nitrilo-tri-acétique couplés directement au dextran et permettant via la fixation d'un cation divalent ( $\text{Ni}^{2+}$  par exemple) la fixation des protéines ligands fusionnées avec une étiquette poly-histidine (H6).

## MATERIEL ET METHODES

### I. Production des protéines recombinantes

#### I.1 Production et purification de H6K5FtsL

La partie extracellulaire de FtsL (résidus M44 à E105) a été fusionnée au coil artificiel K5 (motif KVSALKE répété 5 fois) (190). Un tryptophane a été inséré par mutagenèse dirigée entre l'étiquette H6 en N-terminal et le coil K5 afin de faciliter le dosage par mesure de l'absorbance de la protéine recombinante, qui ne possède pas naturellement d'acides aminés aromatiques. Cette construction nommée *H6K5ftsL* a été clonée dans le plasmide pETduet par Soizic Masson.

La souche RIL pETduet *H6K5ftsL* a été cultivée dans deux Erlenmeyers de 3 L à  $37^\circ\text{C}$ , sous agitation de 250 rpm. Chaque Erlenmeyer contenant un litre de milieu LB ampicilline 100  $\mu\text{g/mL}$  a été inoculé au 1/50 à partir d'une préculture sur la nuit. Quand la DO à 600 nm a atteint une valeur de 0,4, l'expression de la protéine a été induite par l'addition d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1  $\mu\text{M}$ . Après 3 heures d'induction à  $37^\circ\text{C}$ , les cellules ont été centrifugées à 5000 tours.  $\text{min}^{-1}$  pendant 20 minutes dans une centrifugeuse Beckman J-201

équipée du rotor JLA-8.1000 à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 80 mL de tampon A (Tris-HCl 50 mM pH 8 / NaCl 500 mM / imidazole 10 mM). Deux pastilles de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche) dissoute dans 1 mL de ce même tampon ont été ajoutées. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication pendant 2 minutes (sonications de 2 s espacées de 8 s). Le lysat a été centrifugé pendant 20 minutes à 18000 rpm dans un rotor JA 20 (4°C). Le surnageant a été chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité au Nickel (NiNTA superflow, Qiagen) (1,5 ml) préalablement équilibrée avec 10 volume de colonne de tampon A. Une étape de lavage par 50 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 / NaCl 500 mM / imidazole 50 mM a permis d'éliminer les contaminants. Puis la protéine H6K5FtsL a été éluée dans le tampon A 100 mM imidazole. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS 12.5% a permis de déterminer dans quelles fractions se trouve la protéine et son degré de pureté. 20 ml de protéine pure (une seule bande en SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie) ont été dialysés sur la nuit contre 5 L de tampon B (HEPES 10 mM pH 7,4 / NaCl 150 mM / EDTA 50 µM). Une mesure de l'absorbance à 280 nm a été prise afin de déterminer la quantité de protéine produite (12,8 mg) et sa concentration (50 µM).

### **I.2 Production et purification de H6E5DivIC**

La partie extracellulaire de DivIC (résidus S55 à R122) a été fusionnée au coil artificiel E5 (motif EVSALEK répété 5 fois) (190). La souche BL21(DE3) pETduet *H6E5divIC* a été cultivée de la même manière que la souche précédente et induite à une DO<sub>600</sub> de 0,9. La protéine a été purifiée selon le même protocole par une chromatographie d'affinité au nickel. De l'EDTA a été ajouté dans les fractions purifiées pour éviter la dégradation de la protéine par une métalloprotéase. Dix huit ml de protéine ont été obtenus mais vu le degré de pureté observé sur SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (3 bandes contaminantes), une nouvelle étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée. Après équilibration de la colonne par 150 ml de tampon B et injection, la protéine H6E5DivIC a été éluée dans 30 ml de ce tampon B. La protéine a été jugée pure après analyse SDS PAGE 12,5% où une bande unique d'environ 13 kDa est observée après coloration au bleu de Coomassie. La concentration de H6E5DivIC est de 100 µM environ.

### **I.3 Production et purification de DivIB recombinante**

La partie extracellulaire soluble de DivIB (résidus S150 à R396) a été fusionnée à l'étiquette GST (Glutathion-S-transférase). Un site de coupure à la protéase TEV a également été inséré pour obtenir la protéine recombinante sans étiquette. La souche RIL pGEX *GST-divIB*,

inoculée au 1/40 à partir d'une préculture d'une nuit, a été cultivée dans un litre de milieu LB ampicilline 100 µg/mL à 37°C, sous agitation de 250 rpm. Quand la DO à 600 nm a atteint une valeur de 0,9, l'expression de la protéine a été induite par l'addition d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 µM. Après 3 heures d'induction à 37°C, les cellules ont été centrifugées à 5000 tours. min<sup>-1</sup> pendant 20 minutes dans une centrifugeuse Beckman J-201 équipée du rotor JLA-8.1000 à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 40 mL de tampon C (Tris-HCl 50 mM pH 8 / NaCl 150 mM / EDTA 1 mM). Une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche) dissoute dans 1 mL de ce même tampon a été ajoutée puis la suspension a été congelée à -80°C. Après décongélation, les cellules ont été lysées par sonication pendant 2 minutes (sonications de 2 s espacées de 8 s). Le lysat a été centrifugé pendant 20 minutes à 18000 rpm à l'aide du rotor JA 20 (4°C). Le surnageant a été chargé sur une colonne d'affinité au glutathion (résine glutathion sepharose). Puis après un lavage de 40 ml avec du tampon C, la protéine GST-DivIB a été éluée par 15 ml de glutathion réduit 10 mM dans le tampon C. Le clivage par la protéase TEV recombinante a été réalisé 2 h à 37°C avec un rapport enzyme : substrat de 1 : 50. Enfin, la protéine clivée a été dialysée contre 3 fois 500 ml de tampon B. Après deux étapes de chromatographie d'affinité en série, nickel pour éliminer la protéase TEV fusionnée à une étiquette H6, puis glutathion pour capturer la GST-DivIB non clivée ; la protéine DivIB clivée a été récupérée pure à la sortie des deux colonnes. Sa concentration est de 2,5 µM.

## II. Le protocole expérimental

Toutes les expériences de BIACORE<sup>®</sup> ont été réalisées sur le BIACORE 3000. Les surfaces de détection NTA ont été achetées chez BIACORE<sup>®</sup>. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante à une vitesse de 10 µL/min. Le tampon de course est le tampon HBS : HEPES 10 mM pH 7,4 / NaCl 150 mM / EDTA 50 µM / Surfactant P20 0,005%. Toutes les protéines ont été dialysées dans ce tampon de course qui a aussi été utilisé pour toutes les dilutions afin de minimiser les variations d'indice de réfraction à l'injection des échantillons.

### II.1 Cinétique de formation du complexe ternaire

La surface NTA est activée par addition de 10 µL de NiCl<sub>2</sub> 500 µM / HEPES 10 mM / NaCl 150 mM. (Figure 29). Les protéines ligands ont été injectées pendant 5 minutes sur chacune des pistes les unes après les autres. La concentration a été ajustée auparavant par

dilutions successives pour obtenir un niveau de fixation d'environ 500 RU pour tous les ligands (H6K5ftsL/H6E5DivIC, H6K5FtsL, H6E5DivIC et domaine GT de *Listeria monocytogène*). Pour des raisons techniques liées à l'utilisation du BIACORE®, l'injection des 4 ligands a été réalisée séquentiellement (Ligand 1 sur piste 1, puis Ligand 2 sur piste 2, etc...). Des tests ont permis de valider que la fixation du ligand sur chacune des pistes était restée suffisamment stable avant l'injection de l'analyte (DivIB). L'injection de l'analyte a duré 5 minutes puis du tampon de course a été injecté pendant 5 minutes pour visualiser la dissociation du complexe. La régénération de la surface a été accomplie par le passage de 30 µL d'EDTA 350 mM pH 8,3 / HEPES 10 mM / NaCl 150 mM suivie d'un EXTRACLEAN, comme décrit dans le manuel BIACORE®, pour éliminer toutes traces d'EDTA avant l'activation suivante. Les injections d'analyte (DivIB), de concentrations allant de 0 à 900 nM, ont été dupliquées et effectuées dans le désordre pour tester la reproductibilité et éviter les biais liés à l'usure de la surface.

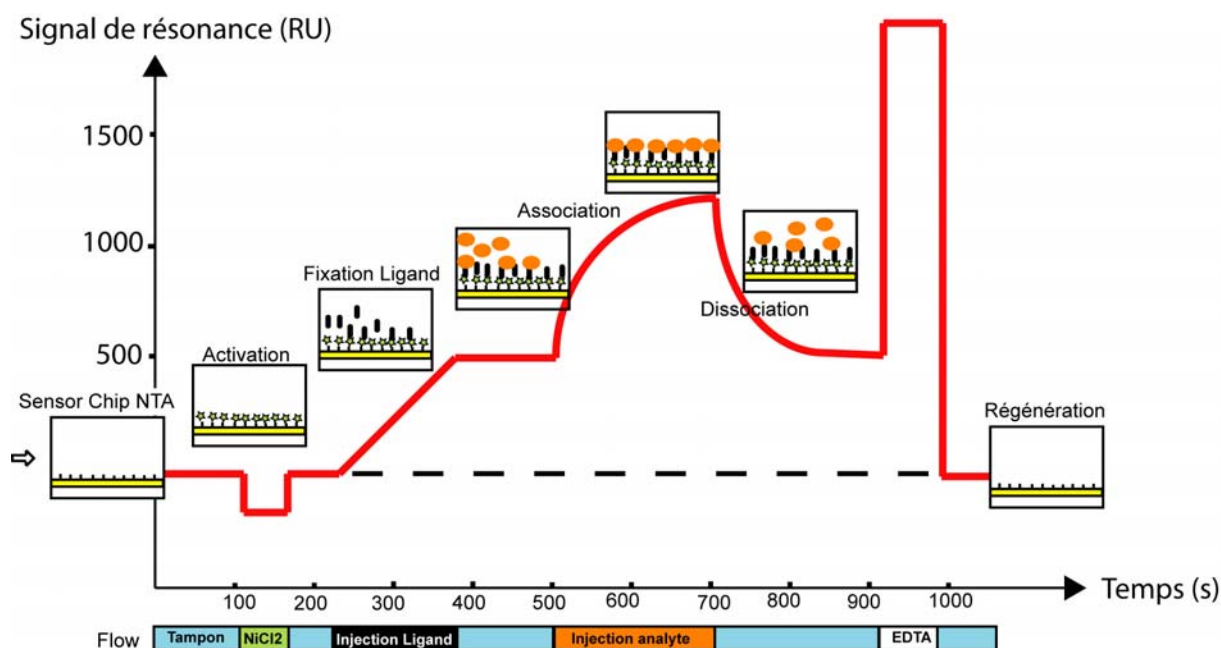


Figure 29. Sensorgramme type obtenu avec les surfaces NTA. Phase 1 : activation de la surface NTA par addition de 10 µL de NiCl<sub>2</sub> 500 µM. Phase 2 : Injection du ligand. Phase 3 : Injection de l'analyte. Phase 4 : Injection de l'EDTA 350 mM afin de régénérer la surface réutilisable pour d'autres fixations. Entre chaque phase, du tampon de course HBS est injecté plus ou moins longtemps.

## II.2 Analyse des sensorgrammes

Les sensorgrammes obtenus ont ensuite été traités avec le logiciel BIAevaluation 3.0, qui permet un ajustement global des données expérimentales au modèle mathématique choisi. L'édition des données a été réalisée avec BIAevaluation 3.0: les phases d'activation, de

fixation du ligand et de régénération ont été supprimées, les sensorgrammes ont été ajustés à zéro en y puis en x. Premièrement, le sensorgramme correspondant à l'addition de tampon de course sur un ligand particulier a été retiré de tous les sensorgrammes correspondant à ce ligand. Puis, le sensorgramme correspondant à la surface de référence (GT recombinant) est soustrait des sensorgrammes cinétiques lui correspondant. Ensuite, l'ajustement des données expérimentales au modèle mathématique a été réalisé de la façon suivante: les curseurs de début et fin d'injection ont été ajustés, ainsi que les zones des phases d'injection et post-injection sur lesquels le calcul sera effectué (Figure 30). Le modèle choisi est l'interaction simple 1:1, dont la réaction est schématisée ci-après:  $A + B \rightleftharpoons AB$ , où A représente l'analyte (DivIB) et B le ligand. Les résultats obtenus sont appelés paramètres cinétiques plutôt que constantes cinétiques, ainsi que constante apparente d'affinité à l'équilibre  $K'$  plutôt que constante d'affinité à l'équilibre car le ligand est immobilisé dans la matrice de dextran. La réaction a été régie par deux constantes de vitesse: la constante de vitesse d'association ( $k_a$  en  $M^{-1}.s^{-1}$ ) dans le sens de la formation du complexe et la constante de vitesse de dissociation ( $k_d$  en  $s^{-1}$ ) dans le sens de la dissociation du complexe. Les constantes apparentes d'équilibre  $K'_a$  ( $M^{-1}$ ) et  $K'_d$  (M) correspondent respectivement aux rapports de  $k_a/k_d$  et  $k_d/k_a$ . Une fois les concentrations en analyte données, l'ajustement des sensorgrammes calculés aux sensorgrammes expérimentaux est réalisé, en gardant les valeurs par défaut fournies par le logiciel pour chacun des paramètres.

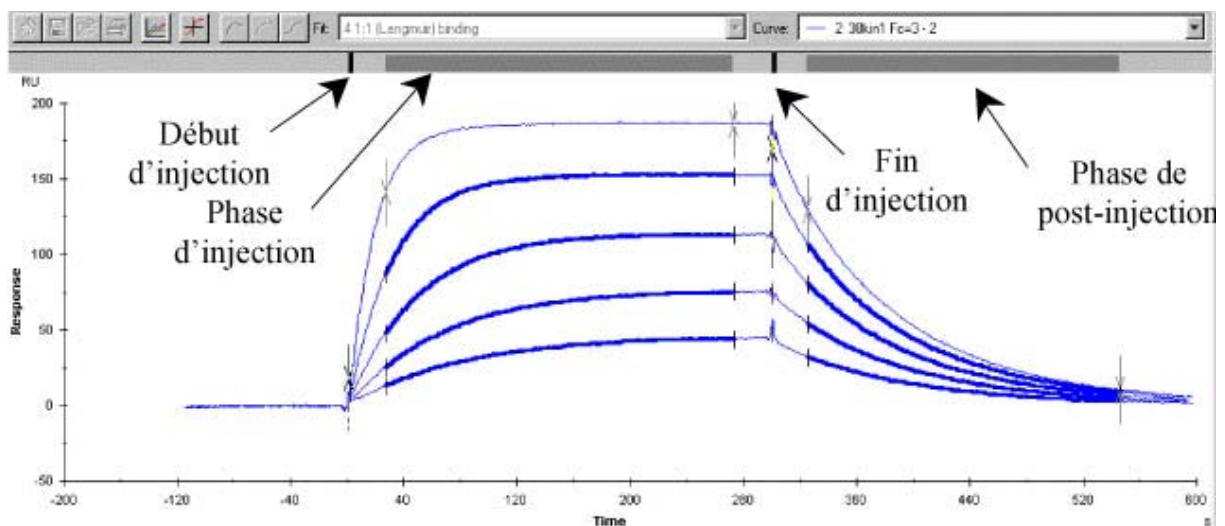


Figure 30. Sélection des données en vue de l'ajustement mathématique avec BIAevaluation 3.0.



## RESULTATS ET DISCUSSION

Au vu des résultats de co-purification des protéines GST-DivIB, H6K5FtsL et H6E5DivIC (Publication n° 1), nous avons souhaité connaître les paramètres cinétiques de l'interaction de ces trois partenaires. L'hypothèse de départ pour la formation du complexe, c'est que DivIB interagit avec un hétéro-dimère formé, H6K5FtsL/H6E5DivIC (voir partie Publication n° 1 – Results - The extracellular domains of DivIB associates with a dimer of FtsL and DivIC to form an obligatory ternary complex). Dans la configuration choisie, la formation de l'hétéro-dimère est contrainte par les coils artificiels K5 et E5, qui sont connus pour hétéro-dimériser. L'interaction de ces deux coils a d'ailleurs largement été étudiée par BIACORE® au sein de l'équipe de G. De Crescenzo (61). Lors de précédentes études, Marjolaine et André ont démontré par la technique de co-purification que DivIB n'interagit pas avec les coiled coils E5 et K5 et que DivIB interagit avec H6K5FFtsL/H6E5DivIC. Les sensorgrammes présentés en Figure 31 montrent l'interaction de DivIB (à plusieurs concentrations) avec H6K5FFtsL/H6E5DivIC (courbes vertes) et pas ou peu avec les protéines H6K5FtsL (courbes rouges) et H6E5DivIC (courbes bleues) seules respectivement.

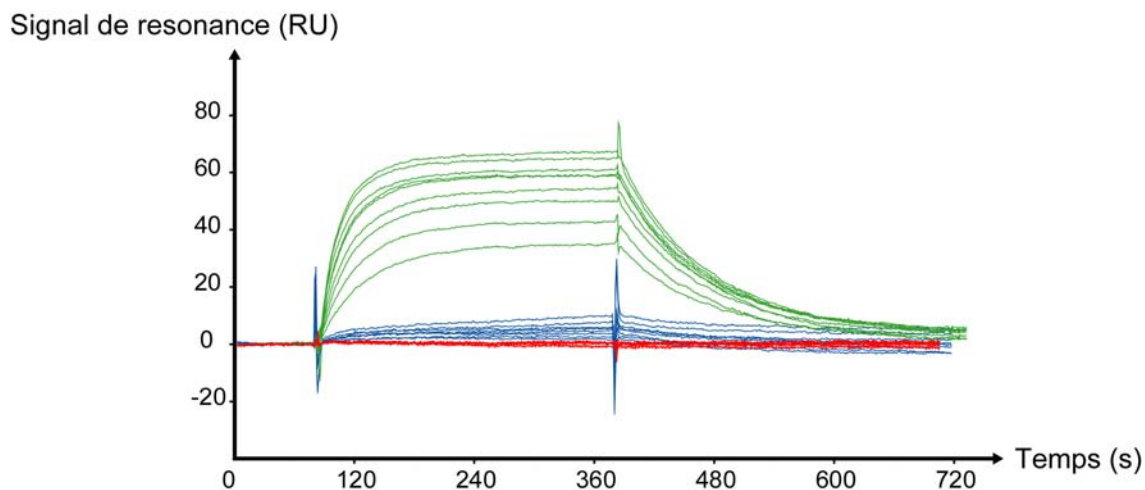


Figure 31. Sensorgramme des cinétiques de fixation de DivIB sur H6K5FtsL/H6E5DivIC (courbes verte), sur H6E5DivIC (courbes bleues) et sur H6K5FtsL (courbes rouge). Les concentrations de DivIB testées vont de 200 nM à 900 nM par incrément de 100 nM.

Le niveau de fixation de DivIB sur l'hétérodimère varie de 20 à 80 RU. L'analyse des données expérimentales globale de toutes les concentrations de DivIB simultanément à l'aide du modèle d'interaction 1 :1 (modèle de Langmuir) nous a permis de déterminer la constante de vitesse d'association  $k_a$  du complexe ternaire qui est de  $3,95.10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et sa constante de

vitesse de dissociation  $k_d$  qui est de  $1,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figure 33). Ces valeurs indiquent une association et une dissociation rapide du complexe ternaire DivIB/H6K5FtsL/H6E5DivIC. La constante apparente d'affinité  $K'_d$  du complexe ternaire résultante ( $k_d/k_a$ ) est de 300 nM. Le complexe bien que peu stable possède une affinité raisonnable. La valeur du  $\chi^2$ , qui est de 0,3, montre un bon ajustement des courbes théoriques aux données expérimentales.

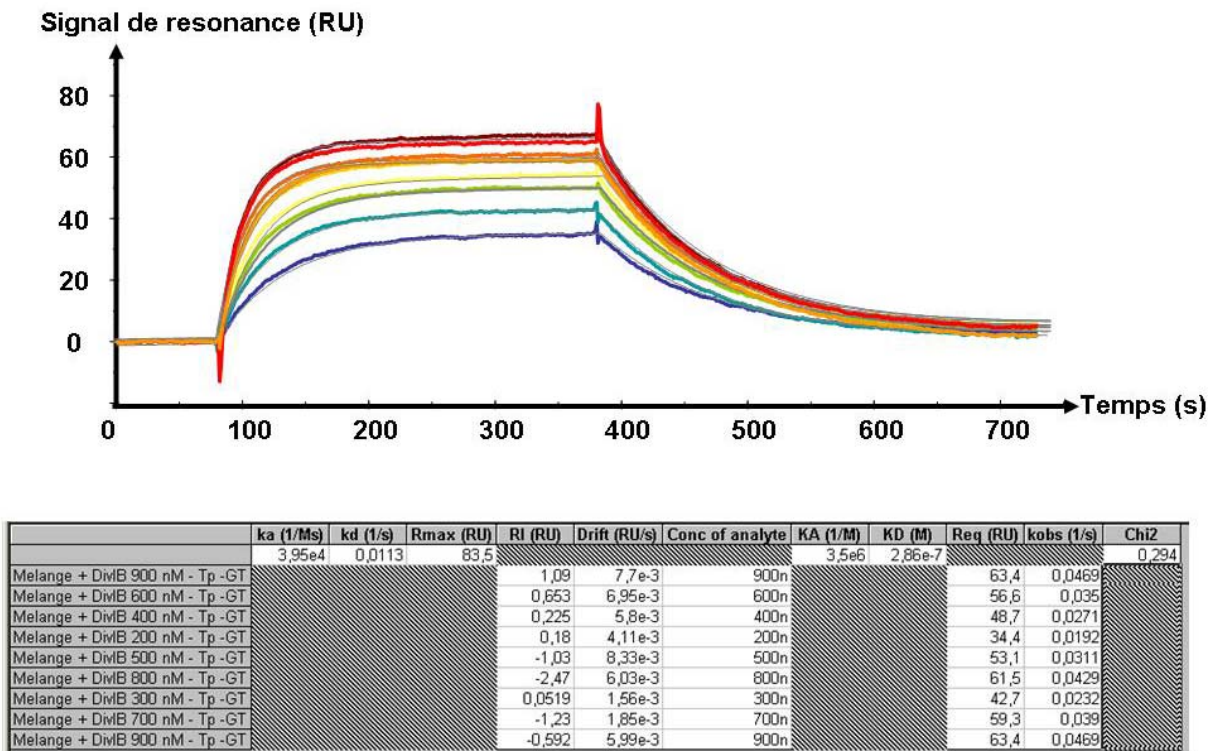


Figure 32. Analyse des sensorgrammes de fixation de DivIB sur l'hétéro-dimère H6K5FtsL/H6E5DivIC par BIAevaluation 3.0. Les données expérimentales sont représentées par des courbes de couleur (bleu foncé : DivIB 200 nM, bleu clair : 300 nM, vert : 400 nM, jaune : 500 nM, orange clair : 600 nM, orange : 700 nM, orange foncé : 800 nM, rouge : 900 nM, rouge foncé : 900 nM) Les courbes théoriques obtenues par un ajustement global des données expérimentales au modèle d'interaction 1 :1 (modèle de Langmuir) sont représentées en gris. Le tableau montre les valeurs de  $k_a$  et  $k_d$  qui sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation, le KD qui représente la constante apparente d'affinité  $K'_d$  et le  $\chi^2$ .

Ces résultats ne correspondent pas à une réalité physiologique, puisque les protéines FtsL, DivIC et DivIB sont des protéines membranaires. La contrainte bidimensionnelle dans les membranes augmente probablement leurs concentrations locales. Néanmoins, ces expériences ont confirmé que les domaines extracellulaires recombinants de FtsL et DivIC seuls n'interagissent pas ou peu avec le domaine extracellulaire de DivIB. Le niveau de fixation de DivIB sur H6E5DivIC tel que n'est pas suffisant pour être analysé (voir chapitre : Existence du complexe ternaire *in vivo*).

# LES PROTEINES DIVIB, DIVIC ET FTSL DE *S. PNEUMONIAE* EXPRIMÉES CHEZ *E. COLI* FORMENT UN COMPLEXE TERNAIRE

## INTRODUCTION

La reconstitution du complexe ternaire *in vitro* a été réalisée avec les protéines recombinantes solubles de *S. pneumoniae*. Les protéines DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* ayant une faible identité de séquence avec leurs orthologues chez *E. coli* et *B. subtilis*, l'existence du complexe ternaire avec les protéines membranaires entières du pneumocoque devait être validé. Un système triple hybride bactérien membranaire a été utilisé. Utiliser la bactérie *E. coli* comme un « tube à essai », c'est étrange et excitant à la fois. Au fond, quoi de plus naturel qu'une membrane bactérienne pour visualiser une interaction de protéines membranaires. Cependant, selon les conseils avisés d'Arthur Kornberg, il faut garder à l'esprit que ce système expérimental, contient plus d'un millier de protéines, d'autres macromolécules, le pH et la force ionique ne sont pas bien défini, la gamme de température est limitée et la concentration des réactants est difficile à contrôler (126). Or, la cellule bactérienne est une bonne solution pour examiner des interactions entre protéines membranaires, qui sont difficilement produites et purifiées de façon soluble. De nombreux systèmes doubles hybrides bactériens ont été décrits (127, 145). Le test de Di Lallo a été choisi car il a déjà été utilisé pour déterminer les interactions des protéines de la division d'*E. coli* (70).

### I. Principe du test double hybride bactérien de Di Lallo *et al.*

Le système double hybride bactérien développé par Di Lallo *et al.* exploite les propriétés du répresseur codé par le gène *cI* du bactériophage  $\lambda$ , déjà utilisé dans d'autres systèmes double hybride (128, 157). Le répresseur du phage  $\lambda$  actif est un homo-dimère formé par deux molécules cI, dont la partie N-terminale est importante pour la reconnaissance et l'interaction avec l'ADN, et la partie C-terminale est importante pour l'homo-dimérisation des deux sous-unités. Pour pouvoir observer des interactions hétéro-dimériques, Di Lallo *et al.* ont construit un opérateur chimérique formé par les deux demi-sites 434 et P22. Cet opérateur ne peut être reconnu que par le répresseur chimérique composé des parties N-terminales des deux monomères P22 et 434, fusionnés aux protéines dont on veut tester l'interaction. Les protéines en interagissant, permettent la reconstitution du répresseur

chimérique, et éteignent la transcription du gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase présent dans la souche d'*E. coli* (69). Les plasmides recombinants  $pcl_{434}$  et  $pcl_{P22}$  contiennent respectivement les parties N- terminales des répresseurs 434 et P22. Le plasmide  $pcl_{434}$  (Figure 33A) est un plasmide à bas nombre de copies dérivé du plasmide pACYC177, portant l'origine de réplcation P15A. Le plasmide  $pcl_{P22}$  (Figure 33B) est un plasmide à haut nombre de copies, dérivant de pC132 et possédant l'origine de réplcation ColEI, compatible avec P15A. Les gènes codant pour les protéines d'intérêt peuvent être clonés en phase avec les parties N-terminales des répresseurs grâce au site de restriction des enzymes *SalI* et *BamHI*.

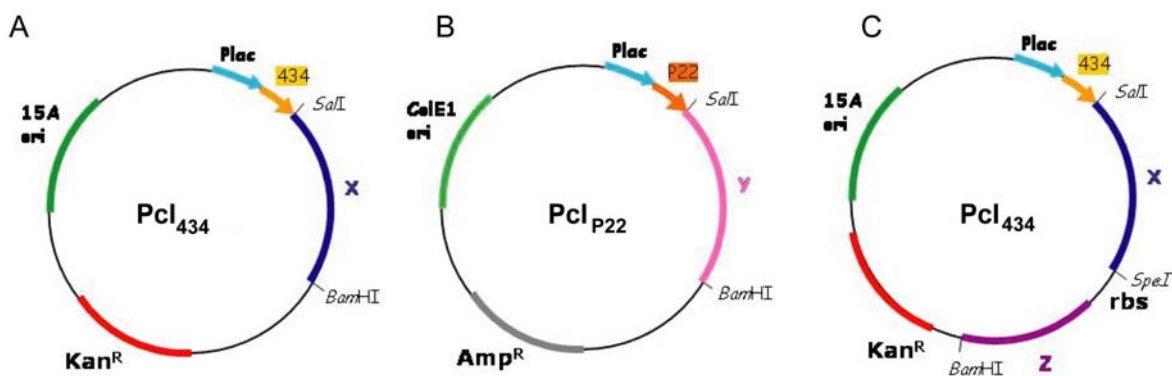


Figure 33. Carte des plasmides  $pcl_{434}$  et  $pcl_{P22}$ . Le plasmide  $pcl_{434}$  (A) est un plasmide à bas nombre de copies dérivant du pACYC177 possédant le gène codant pour le domaine N-terminal de  $cI_{434}$ . Ce plasmide porte l'origine de réplcation (Ori) P15A, capable de coexister avec l'origine de réplcation ColEI porté sur le plasmide à haut nombre de copies  $pcl_{P22}$  (B). La carte du plasmide (C) illustre la stratégie de clonage pour le test triple hybride. Kan<sup>R</sup> : Gène de résistance à la kanamycine, Amp<sup>R</sup> : Gène codant pour la  $\beta$ -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline, Plac : promoteur inductible à l'IPTG, rbs : Site de fixation du ribosome.

## II. Modifications apportées au système

Pour réaliser le test triple hybride, nous avons souhaité obtenir un plasmide « navette », en l'occurrence il s'agit du pET30b, dans lequel les gènes *divIB*, *divIC* et *ftsL* ont été clonés. Ce plasmide va nous servir pour les sous-clonages des gènes dans les vecteurs  $pcl_{434}$  et  $pcl_{P22}$  avec les enzymes de restrictions *SalI* et *BamHI*, ainsi que sur le plasmide  $pcl_{434}$  en deuxième position d'un opéron (Gène Z Figure 33C) avec les enzymes *XbaI* et *BamHI*. Les sites *XbaI* et *SpeI* sont compatibles. Ceci nous permet de récupérer le site d'attachement du ribosome présent sur le vecteur pET30b et de co-exprimer une protéine Z non fusionnée au domaine N-terminal du répresseur. L'hypothèse est que l'ajout de cette protéine permettra l'interaction des deux autres fusionnées aux domaines N-terminaux du répresseur (Figure 34).

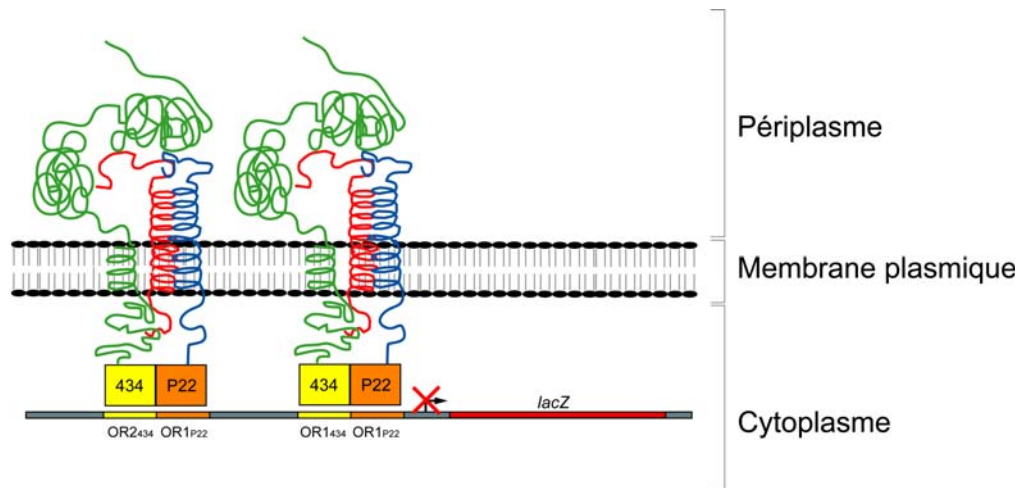


Figure 34. Principe du triple hybride bactérien membranaire. Le répresseur chimérique est composé des domaines N-terminaux des monomères P22 et 434 ainsi que des protéines fusionnées en C-terminal dont on veut tester l'interaction. La troisième protéine est co-exprimée avec celle fusionnée au domaine N-ter du monomère 434 du répresseur. Elle est non marquée mais permet ou pas de moduler l'interaction des protéines fusionnées à P22 et 434. Si ces protéines interagissent, le répresseur chimérique reconstitué interagit avec l'opérateur chimérique P22-434 et réprime ainsi la transcription du gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase présent sur le chromosome de la souche *E. coli* R721.

## MATERIEL ET METHODES

### I. Clonage des gènes dans $pcl_{434}$ et $pcl_{P22}$

#### I.1 Clonage dans le vecteur pET30b

Les gènes *divIB*, *divIC* et *ftsL* ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de la souche R6 grâce aux primers *divIB*-F (5' GGTGCCATATGTCGACGTCAAAAGATAAGAAAAATGAGGACAAAGAAACC 3') et *divIB*-R (5' CGCCCTCGAGGATCCACTAGTCTAGCGACGCGATGAACGC 3'), *divIC*-F (5' GGTGCCATATGTCGACGTCTAAAAATATTGTACAATTGAATAATTC 3') et *divIC*-R (5' CGCCCTCGAGGATCCACTAGTTTACCTTTGAAGCAAGTCAGG 3'), *ftsL*-F (5' GGTGCCATATGTCGACGGCAGAAAAAATGGAAAAACAGG 3') et *ftsL*-R (5' CGCCCTCGAGGATCCACTAGTTTACTCCGCTATTCTAATATTTTCATTG 3'). Les sites *SalI*, *BamHI* et *SpeI* sont respectivement en vert, en bleu et en rouge. Les produits d'amplification ont été introduits dans pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene) grâce au kit « pPCR-Script Amp cloning kit » en suivant les instructions du kit. Les produits de ligation sont transformés dans les cellules XL10-Gold compétentes commerciales. Les clones positifs ont été détectés après digestion des plasmides par les enzymes *AlwNI* et *NdeI*. Les inserts *divIB*, *divIC* et *ftsL* ont été sous clonés dans le vecteur pET30b par digestion enzymatique *NdeI* *XhoI* et ligation. Les mix réactionnels de ligation étaient les suivants : 2  $\mu$ L de vecteur

digéré par *NdeI XhoI* (20 ng.μL<sup>-1</sup>), 1 μL de tampon ligase 10x (Fermentas), 2 μL de T4 DNA ligase (Fermentas), et 5 μL de *divIB* (40 ng.μL<sup>-1</sup>) de *divIC* (20 ng.μL<sup>-1</sup>) ou *ftsL* (20 ng.μL<sup>-1</sup>) digéré *NdeI XhoI*. La réaction de ligation a été incubée sur la nuit à 16°C. Puis, 5 μL des produits de ligation ont été transformés dans les cellules DH5α compétentes (préparées au laboratoire selon le protocole d'Inoue *et al.*, 133) (50 μL). Les clones positifs DH5α pET30b-*divIB*, *divIC* et *ftsL* ont été détectés par digestion *MluI XhoI* des plasmides. Les inserts ont été vérifiés par séquençage.

## I.2 Mutagenèse dirigée de *divIB*

Pour réaliser les sous-clonages dans les vecteurs p*cl*<sub>434</sub> et p*cl*<sub>P22</sub>, une digestion *SalI BamHI* a dû être exécutée. De plus pour pouvoir ajouter *ftsL* en position 2 sur pET30b-*divIB*, il a fallu accomplir une digestion *SpeI BamHI* du vecteur pET30b-*divIB*. Or, le gène *divIB* comporte les sites de restriction *SalI* et *SpeI*. Nous avons donc procédé à une mutagenèse dirigée « silencieuse » modifiant la séquence en nucléotides du gène *divIB* sans modifier la séquence protéique de DivIB avec les amorces *divIB* T738C-F (5' CAGTGGTCAGCTTGAGACCAGTTCTGTGAGTCTGAAC 3') et *divIB* C1020T-R (5' GTAAATTCCAGCTTCCATATCGACCACACTCGGTTC 3') à l'aide du kit « Quick change multi site directed mutagenesis » (Stratagen). Les produits d'amplification (1 μL) (digérés 1 heure à 37°C avec 1 μL d'enzyme *dpnI* (10 U.μL<sup>-1</sup>)) ont été transformés dans les cellules XL1 blue. Les plasmides obtenus ont été digérés soit par *SalI XhoI* soit par *SpeI XhoI* pour vérifier la disparition des sites de restriction *SalI* et *SpeI*. Un clone positif pET30-*divIB*<sup>\*</sup> a été vérifié par séquençage.

## I.3 Sous-clonage dans les vecteurs p*cl*<sub>434</sub> et p*cl*<sub>P22</sub>

Les inserts *divIB*<sup>\*</sup>, *divIC* et *ftsL* ont été clonés dans les vecteurs p*cl*<sub>434</sub> et p*cl*<sub>P22</sub> par digestion *SalI BamHI* et ligation. Les fragments correspondant aux inserts *divIB*<sup>\*</sup>, *divIC* et *ftsL* et aux vecteurs p*cl*<sub>434</sub> et p*cl*<sub>P22</sub> digérés *SalI BamHI* ont été purifiés sur gel d'agarose 1% avec le kit Nucleospin extract (Qiagen). Les mélanges réactionnels de ligation étaient les suivants : 3 μL d'insert *divIB*<sup>\*</sup>, *divIC* et *ftsL* à 10 ng.μL<sup>-1</sup> digérés *SalI BamHI*, 1 μL T4 DNA Ligase (Fermentas), 1 μL de tampon ligase 10x (Fermentas), 5 μL de vecteur p*cl*<sub>434</sub> (20 ng.μL<sup>-1</sup>) ou p*cl*<sub>P22</sub> (20 ng.μL<sup>-1</sup>). La réaction a été incubée dans la nuit à 16°C. Les produits de ligation (5μL) ont été transformés dans les cellules DH5α compétentes. Les cellules transformées avec le vecteur p*cl*<sub>434</sub> ont été étalées sur boîte LB agar contenant de la kanamycine 34 μg.ml<sup>-1</sup> et celles transformées avec p*cl*<sub>P22</sub> ont été étalées sur boîtes LB agar

contenant de l'ampicilline 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Une digestion analytique des plasmides par *SalI* *BamHI* a permis de s'assurer de l'insertion des inserts dans les différents vecteurs.

Pour insérer *ftsL* sur le plasmide *pCI<sub>434</sub>-divIB\**, le vecteur a été digéré par *SpeI* *BamHI*, et l'insert a été sorti de *pET30b-ftsL* par digestion *XbaI* *BamHI*. Les fragments correspondants à l'insert *ftsL* et au vecteur *pCI<sub>434</sub>-divIB* clivés ont été purifiés sur gel d'agarose 1% puis à l'aide du kit nucleospin extract (Qiagen). La ligation a été effectuée comme ci-dessus avec 6  $\mu\text{L}$  d'insert (5  $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ ) et 2  $\mu\text{L}$  de vecteur (1  $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ ). Le produit de ligation (5  $\mu\text{L}$ ) a été transformé dans les cellules DH5 $\alpha$  compétentes. Une PCR sur deux colonies transformées avec les amorces *divIB-F* et *ftsL-R* a permis de détecter un clone positif.

## II. Préparation des cellules R721 compétentes

La souche R721 (*E. coli* K12 *supE thy*  $\Delta(lac-proAB)$  *F'*[*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> *lacZ* $\Delta$ M15] *glpT::O-P<sub>434/P22</sub> lacZ*) (70) nous a été fournie par le professeur Paolozzi (Dipartimento di Biologia, Università 'Tor Vergata', Roma, Italy). À sa réception nous l'avons réétalée sur LB agar contenant du chloramphénicol 34  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

La préparation de cellules R721 a été faite grâce au protocole d'Inoue *et al.* (133). Brièvement, 250 mL de LB  $\text{MgSO}_4$  20 mM inoculés au 1/100 à partir d'une préculture sur la nuit ont été mis en culture jusqu'à une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,25. Après 10 minutes dans la glace, les cellules ont été récoltées par centrifugation (3000g 10min 4°C). Les culots cellulaires ont été repris dans 80 mL de tampon TB froid (PIPES NaOH pH 6,7 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  15 mM, KCl 250 mM,  $\text{MnCl}_2$  55 mM). Puis après 10 minutes sur glace, les cellules ont été à nouveau centrifugées à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été repris dans 20 mL de TB froid puis 1,5 mL de DMSO ont été ajoutés. Après 10 minutes à 4°C, les cellules ont été aliquotées par 500  $\mu\text{L}$ , et congelées dans l'azote liquide avant d'être transférées dans le congélateur à -80°C.

## III. Test $\beta$ -galactosidase

Inoculation au 1/1000 de 10 mL de LB IPTG 0,1 mM contenant du chloramphénicol 34  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  et de l'ampicilline 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  et/ou de la kanamycine 30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  (voir condition citées précédemment) avec des clones issus des boîtes de transformation de la souche R721 avec les plasmides voulus. Les cultures ont été réalisées à 34°C et 250 rpm. Quand la  $\text{DO}_{600}$  a atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, les souches ont été conservées sur la glace en attendant que les autres souches soient arrivées à la même  $\text{DO}_{600}$  (la conservation sur la glace n'a pas modifié l'activité  $\beta$ -galactosidase mesurée, données non montrées).

Pour mesurer l'activité  $\beta$ -Galactosidase des souches, 700  $\mu$ L de tampon Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mM/  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM/ KCl 10 mM/  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM/  $\beta$ -mercapto éthanol 50 mM) et 25  $\mu$ L de toluène ont été ajoutés aux 300 $\mu$ L de culture dans un tube eppendorf 1,5ml. Le tout a été mélangé 30 secondes par vortex. Puis le toluène s'est évaporé pendant 20 à 30 minutes sous la hotte. 700 $\mu$ L du fond du tube ont été transférés dans des barrettes de 2ml.

Pour la réaction enzymatique, les tubes ont été transférés dans un bain marie à 30°C. 140 $\mu$ L d'ONPG (4 mg.ml<sup>-1</sup>) préparé extemporanément ont été ajoutés, et le chronomètre démarré. Lorsque le mélange réactionnel s'est coloré en jaune (environ après 1 minute), la réaction a été arrêtée par addition de 300  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M et le temps de réaction a été mesuré. Les tubes ont alors été centrifugés à 16000 g pendant 2 minutes et l'absorbance à 420 nm du surnageant a été mesurée. Le blanc a été réalisé avec 185  $\mu$ L de LB et de l'eau qsp 1 ml. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été exprimée en unité Miller et a été calculée de la façon suivante :

Activité  $\beta$ -Gal =  $(\text{DO}_{420} * 1000) / (\text{DO}_{600} * V * T)$  où V, représente le volume de culture soit 0,3 ml et T, le temps de la réaction soit 1 minutes ou 1,5 minutes selon le test.

Enfin, l'activité  $\beta$ -galactosidase a été exprimée en % par rapport à l'activité enregistrée pour la souche R721 sans plasmide. Un ratio de moins de 50% a montré que les protéines testées interagissent.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats du test de triple hybride montrent que les protéines membranaires DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* forment un complexe ternaire puisque l'activité (Figure 35). Les protéines DivIC et DivIB semble interagir légèrement. Il n'est pas certain que ce test triple hybride soit strictement « quantitatif ». L'expérience ayant été réalisée trois fois avec des cultures différentes, les niveaux d'activité  $\beta$ -galactosidase mesurés sont proches (voir les barres d'erreurs). De plus, les résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par BIACORE® qui montrent une légère interaction entre les domaines extracellulaires des protéines DivIB et DivIC. Au cours de la réalisation de ces travaux, l'équipe de Karimova *et al.* a publié l'existence de ce complexe pour les protéines FtsQ, FtsB et FtsL d'*E. coli* par un autre système triple hybride bactérien (139). L'équipe de Daniel *et al.* a démontré l'existence de ce complexe ternaire pour les protéines membranaires DivIB, DivIC et FtsL de *B. subtilis* par des systèmes triple hybride bactérien et de levure (54). Il n'y a donc plus de doutes quant



à l'existence de ce complexe ternaire, isolé par immunoprecipitation (32), démontré par des approches triples hybrides, bactérien et de levure, et reconstitué *in vitro* par une technique de co-purification (190).

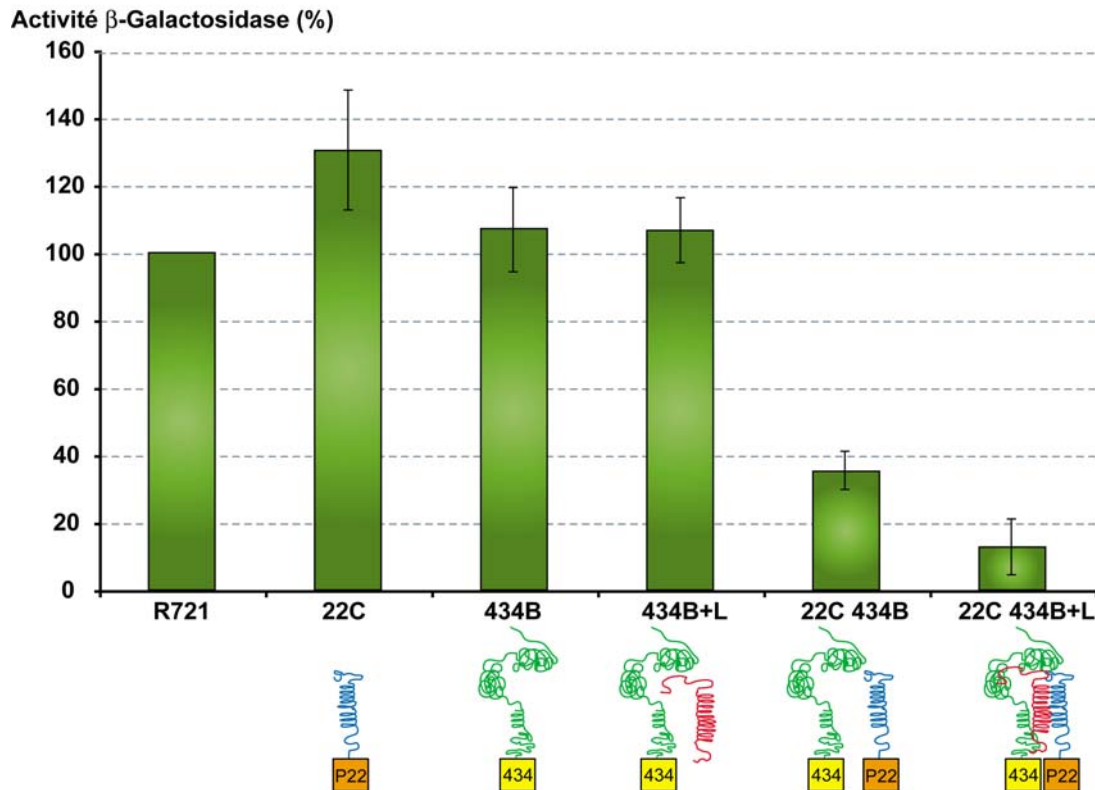


Figure 35. DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* forment un complexe ternaire. 700  $\mu$ L de tampon Z ont été ajoutés à 300  $\mu$ L de culture à  $DO_{600} = 0,3$ . Puis 25  $\mu$ L de toluène ont été additionnés avant de vortexer pendant 30 secondes. Après 30 minutes, 700  $\mu$ L du fond du tube ont été transférés dans des barrettes de 2ml. 140  $\mu$ L d'ONPG (4 mg.mL<sup>-1</sup>) préparé extemporanément ont été ajoutés et la réaction a été incubée à 37°C. Après 1 minute environ, la réaction a été arrêtée par addition de 300  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M et le temps de réaction a été mesuré. Les tubes sont alors centrifugés à 16000 g pendant 2 minutes et l'absorbance à 420 nm du surnageant a été lue. L'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en pourcentage par rapport celle de la souche de référence R721. C=DivIC, B=DivIB, L=FtsL Les barres d'erreurs représentent l'écart type pour 3 expériences.

Les protéines DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* forment un complexe ternaire. Les protéines membranaires DivIB et DivIC interagissent plus faiblement. Le complexe trimérique est conservée chez plusieurs espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif.



## PRESENTATION DE LA PUBLICATION N° 2

Le Gouëllec, A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T and Zapun, A. (2008) Roles of pneumococal DivIB in cell division. *Journal of Bacteriology* **Soumis pour publication**

### INTRODUCTION

Etudier la fonction des protéines DivIB, DivIC et FtsL chez le pneumocoque va générer des connaissances sur le mécanisme moléculaire de division cellulaire d'un ovocoque à Gram positif. Or, la division bactérienne est intimement liée à la morphogénèse des bactéries. L'essentialité de DivIB/FtsQ est différente chez *B. subtilis* et *E. coli*. L'apport de connaissances chez *S. pneumoniae* peut clarifier en partie certaines ambiguïtés.

D'autre part, l'étude de ce complexe chez le pathogène *S. pneumoniae* assure également la base d'un travail à plus long terme. Pour trouver des molécules inhibitrices de la formation de ce complexe, mieux vaut connaître sa fonction, ses épitopes d'interaction et sa structure tridimensionnelle.



# Roles of Pneumococcal DivIB in Cell Division<sup>▽</sup>

Audrey Le Gouëllec,<sup>1</sup> Laure Roux,<sup>1</sup> Daniela Fadda,<sup>2</sup> Orietta Massidda,<sup>2</sup>  
Thierry Vernet,<sup>1\*</sup> and André Zapun<sup>1</sup>

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale (Université Joseph Fourier, CNRS UMR 5075, CEA),  
Grenoble, France,<sup>1</sup> and Dipartimento di Scienze e Tecnologia Biomediche, Sez. Microbiologia Medica,  
Università di Cagliari, Cagliari, Italy<sup>2</sup>

Received 14 March 2008/Accepted 17 April 2008

**DivIB, also known as FtsQ in gram-negative organisms, is a division protein that is conserved in most eubacteria. DivIB is localized at the division site and forms a complex with two other division proteins, FtsL and DivIC/FtsB. The precise function of these three bitopic membrane proteins, which are central to division process, remains unknown. We report here the characterization of a *divIB* deletion mutant of *Streptococcus pneumoniae*, which is a coccus that divides with parallel planes. Unlike its homologue FtsQ in *Escherichia coli*, pneumococcal DivIB is not required for growth in rich medium, but the  $\Delta divIB$  mutant forms chains of diplococci and a small fraction of enlarged cells with defective septa. However, the deletion mutant does not grow in a chemically defined medium. In the absence of DivIB and protein synthesis, the partner FtsL is rapidly degraded, whereas other division proteins are not affected, pointing to a role of DivIB in stabilizing FtsL. This is further supported by the finding that an additional copy of *ftsL* restores growth of the  $\Delta divIB$  mutant in defined medium. Functional mapping of the three distinct  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  domains of the extracellular region of DivIB revealed that a complete  $\beta$  domain is required to fully rescue the deletion mutant. DivIB with a truncated  $\beta$  domain reverts only the chaining phenotype, indicating that DivIB has distinct roles early and late in the division process. Most importantly, the deletion of *divIB* increases the susceptibility to  $\beta$ -lactams, more evidently in a resistant strain, suggesting a function in cell wall synthesis.**

AQ: A

**Fn1** Cell division is a vital process; indeed, it may define life itself. Understanding cell division in microorganisms is also important in order to design innovative therapeutic strategies. In this work, we investigated an aspect of bacterial cell division in the pathogen *Streptococcus pneumoniae*, which is estimated by the WHO to cause more than 1 million deaths per year worldwide. The pneumococcus has the shape of an elongated ellipsoid surrounded by a circular outgrowth of cell wall that marks the site of the next division, perpendicular to the long axis. The term “ovococci” was recently proposed to distinguish such cells (streptococci, enterococci, and lactococci) from truly spherical cocci (e. g., *Staphylococcus aureus*) (53). Pneumococcal cells are generally found as diplococci or short chains. The mechanisms of division, and more generally morphogenesis, have been studied mostly in the model organisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (18, 20, 23). These numerous studies have uncovered several components of the divisome, which can be defined, if not as a complex, at least as the functional ensemble of proteins localized at the division site and participating in the process. Eight conserved, mostly essential proteins constitute the core of the divisome: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ/DivIB, FtsL, FtsB/DivIC, FtsW, and FtsI. This core set of proteins is found in both gram-positive and gram-negative organisms. Additional, less conserved division proteins are found in various phylogenetic lineages. The core division proteins are listed here in the conditional order of their recruitment at the division site of *E. coli* (for a review, see reference 23). Progress

has been made on several aspects of cell division, and some functions can be attributed to several division proteins (20, 23). FtsZ forms polymers with a circular distribution on the cytoplasmic side of the membrane at the site of division and governs the recruitment of the other proteins. The dimerization or polymerization of FtsA stabilizes the FtsZ ring, and FtsA may mediate the interaction between FtsZ and the membrane (31, 47). FtsK is involved in chromosome segregation and membrane fusion. FtsI, which is a septal penicillin-binding protein, and probably FtsW participate in cell wall synthesis. However no precise function is known for the three proteins FtsQ/DivIB, FtsL, and FtsB/DivIC.

Despite some differences in the conditional order of recruitment between *E. coli* and *B. subtilis* (20), it appears that recruitment of FtsQ/DivIB, FtsL, and FtsB/DivIC occurs in the middle of the process. In *E. coli*, the localization of FtsQ at the division site is a prerequisite for the recruitment of FtsL and FtsB, and the presence of FtsL and FtsB at the division site is mutually dependent (7, 22). In *B. subtilis*, the presence of FtsL and DivIC at mid-cell also depends on the presence of DivIB and reciprocally, at least at the temperature at which DivIB is essential (14, 30). These results suggested strongly the existence of a complex of these three proteins. Through their extracellular region predicted to form a coiled coil, a direct interaction between FtsL and FtsB/DivIC was expected. The formation of the ternary complex was confirmed by yeast and bacterial triple-hybrid experiments (16, 28). It was isolated by coimmunoprecipitation in *E. coli* (6) and reconstituted in vitro with recombinant soluble forms of the pneumococcal proteins (37).

DivIB is a bitopic membrane protein with a variable N-terminal cytoplasmic region, a single transmembrane segment,

\* Corresponding author. Mailing address: Institut de Biologie Structurale, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France. Phone: 33 4 38 78 92 03. Fax: 33 4 38 78 54 94. E-mail: thierry.vernet@ibs.fr.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on ●●●●●●.

and a periplasmic or extracellular domain containing a conserved region of about 200 amino acids adjacent to the transmembrane segment. The extracellular domain is important for the function and is necessary and sufficient for the localization of FtsQ/DivIB, provided that it is anchored to the membrane (5, 9, 12, 27, 29), although the transmembrane segment also contributes to the septal localization of FtsQ/DivIB (46, 51). FtsQ is a low-abundance protein, with an estimated abundance of about 50 molecules per cell in *E. coli* (9). DivIB in *B. subtilis* and *S. pneumoniae* was estimated to be somewhat more abundant, with 5,000 and 200 molecules per cell, respectively (37, 44).

Differences also exist between various species in regard to the essentiality of *ftsQ/divIB* under laboratory conditions. The gene *ftsQ* is essential in *E. coli* (5, 9, 12, 27). In *Streptomyces coelicolor*, *divIB* is dispensable for mycelial growth but is required for cell division (34). In *B. subtilis*, *divIB* is essential only at high temperature (2). This essentiality of *divIB* could be attributed to its role in stabilizing at high temperature the essential FtsL. FtsL has a high turnover in *B. subtilis* and disappears rapidly after its expression is stopped (14). At high temperature in a thermosensitive *divIB* mutant, FtsL also disappears rapidly, indicating the stabilizing role of DivIB. Note that this effect could explain the absence of FtsL at the division site in the *divIB* thermosensitive mutant (14). In addition, overexpression of FtsL alleviates the essentiality of *divIB* (14). In *B. subtilis*, FtsL is degraded by the membrane protease YluC (3). It is not known if the removal of FtsL itself is important or if degradation products are also effectors of the regulation of cell division. In *E. coli*, FtsL is also regulated at the transcriptional level by DnaA to stop cell division in case of DNA damage (25). In contrast to its effect on FtsL, DivIB regulates negatively the amount of DivIC in *B. subtilis*. That is, the amount of DivIC decreases in the absence of FtsL when DivIB is present but remains constant in the absence of DivIB (14, 16).

The study of morphologically distinct organisms can bring important new insights, as exemplified by recent studies on the division of *Caulobacter crescentus* (4, 19), *Staphylococcus aureus* (39), or *S. coelicolor* (1, 32). With this aim of providing new data on the function of DivIB, we report here the characterization of a *divIB* deletion mutant of *S. pneumoniae*. Whereas both *B. subtilis* and *E. coli* are rod-shaped bacteria, *S. pneumoniae* is an elongated coccus, or "ovococcus," with parallel planes of division (53). Like *B. subtilis*, the pneumococcus is gram positive, while *E. coli* is gram negative. In *E. coli*, the *dcw* cluster forms essentially one operon and *ftsQ* is adjacent to *ftsA* and *ftsZ*, whereas in *B. subtilis*, the *divIB* gene is separated from *ftsA* and *ftsZ* by intervening genes. In *S. pneumoniae*, the *dcw* genes are distributed in three distinct regions and *divIB* is associated with *mur* genes, is involved in cell wall synthesis, but is separated from *ftsA* and *ftsZ* (33).

The periplasmic region of FtsQ/DivIB is organized in three domains termed  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  (Fig. 1), following a structural study carried out with recombinant DivIB from *Geobacillus stearothermophilus* (43) and recent localization experiments in *B. subtilis* (51). The crystal structures of the periplasmic domains of FtsQ from *E. coli* and *Yersinia enterocolitica* have been reported recently (49). The  $\alpha$  domain is proximal to the cytoplasmic membrane and coincident with the polypeptide transport-associated domain, which was proposed previously to function as a molecular chaperone (43, 45, 49). The  $\alpha$  domain

in recombinant soluble form of the extracellular part of DivIB from *S. pneumoniae*, like that of *G. stearothermophilus*, is readily digested by trypsin and was found to be largely unfolded by nuclear magnetic resonance spectroscopy (S. Masson and A. Zapun, unpublished data). The  $\beta$  domain is compact and resistant to tryptic digestion (covering residues 220 to 361, as determined by N-terminal sequencing (VKEYDIVA) and electrospray mass spectrometry (1,5841 Da) (I. Petit, unpublished data). The structure of the  $\beta$  domain from *G. stearothermophilus* was solved by nuclear magnetic resonance spectroscopy (43). The  $\alpha$  and  $\beta$  domains constitute the 200-residue-long conserved region of FtsQ/DivIB. The C-terminal  $\gamma$  domain either is highly variable or is absent in some species (e.g., *Haemophilus influenzae* and *Legionella pneumophila*). The sequence of the C-terminal tail suggests that it is unfolded, and it is digested by trypsin in recombinant DivIB proteins. The 15 C-terminal residues of *E. coli* FtsQ that could be attributed to a  $\gamma$  domain, on the basis of sequence analysis, were found to be disordered in the crystal structure (49). Some uncertainties regarding the limit of the  $\beta$  and  $\gamma$  domains are discussed and addressed in this work by complementation experiments with pneumococcus.

Lastly, several clues point to a role of FtsQ/DivIB in the regulation of cell wall synthesis at a late stage of division (11, 35). No gene encoding an FtsQ/DivIB orthologue was identified in the genomes of bacteria without cell walls (32). Moreover, one *E. coli* mutant isolated following culture over many generations in the presence of penicillin and sucrose grows as a protoplast L-form type. Such mutants divide with a much reduced amount of cell wall. In one such strain the *ftsQ* gene codes for a truncated protein in the periplasmic domain after residue 131 (48). In *E. coli*, the overexpression of FtsQ exacerbates the dominant negative effect of PBP3 mutants (38). Also, when *divIB* is deleted in *B. subtilis*, sporulation efficiency drops dramatically (41), but the polar septa that form nevertheless are thicker, supporting a role of DivIB in the regulation of the synthesis of the peptidoglycan during sporulation (41). Lastly, two *sib* mutants (for "suppressor of *divIB*") were isolated by spreading the *divIB* null mutant of *B. subtilis* on nutritive agar at 49°C. These suppressor mutations result in single amino acid substitutions in PBP2B (the orthologue of FtsI), which participate in the synthesis of the septal peptidoglycan during division. Both amino acid changes are in the noncatalytic N-terminal domain of the extracytoplasmic region of PBP2B and are sufficient to circumvent the need for DivIB (16). Finally, the coordinated expression of *divIB* and *murB* is important for growth and sporulation in *B. subtilis* (42). Increased expression of *divIB* reduces the requirement for MurB, an enzyme that participate in the synthesis of the peptidoglycan precursor. Here, we report another observation that supports a role for DivIB in peptidoglycan synthesis, as the deletion of *divIB* increases specifically the sensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics known to target cell wall synthesis.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, growth conditions, and transformation.** The bacterial strains used in this work are listed in Table 1. Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> in 40 ml of Bacto Todd-Hewitt (TH) medium (Difco) or in a chemically defined (CD) medium (50) supplemented with 0.5 g liter<sup>-1</sup> choline but without L-asparagine, L-cystine, hydroxy-L-proline, and L-tyrosine.

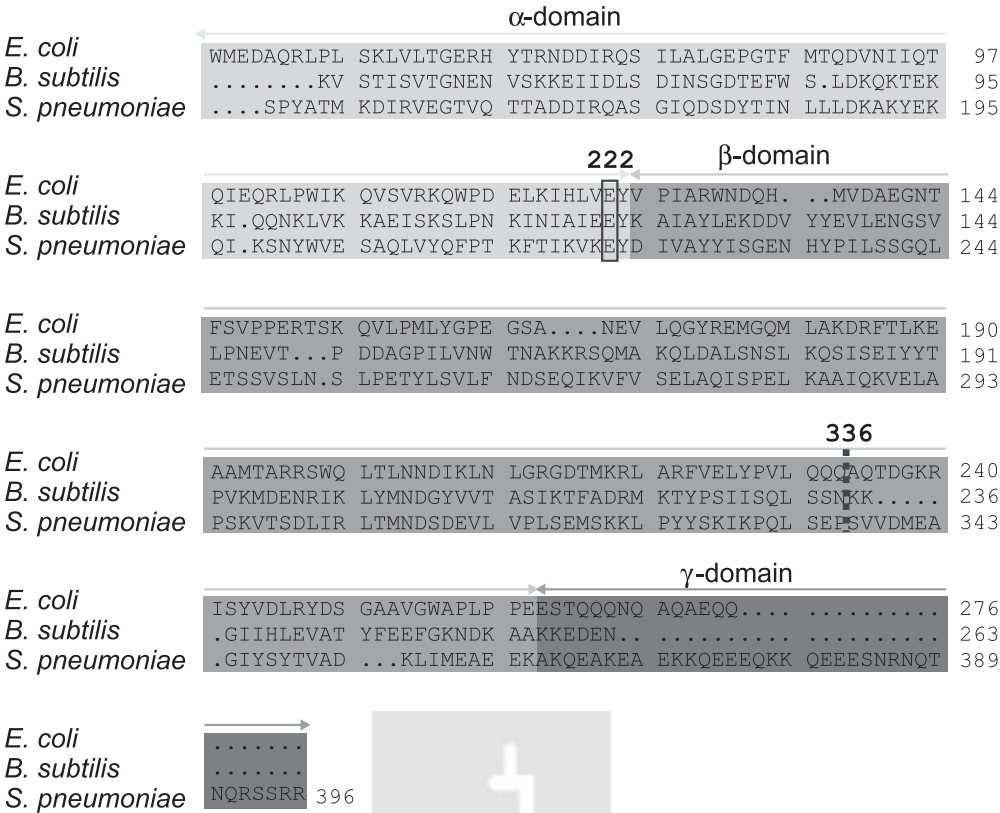


FIG. 1. Sequence alignment of the DivIB extracytoplasmic region. The alignment was generated with ClustalW, using in addition to the sequences shown those of *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *C. crescentus*, *H. influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *S. coelicolor*, *Bacillus bacilliformis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhizobium meliloti*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus hirae*, *S. aureus*, *L. pneumophila*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pyogenes*, and *Geobacillus kaustophilus*. The domains were defined by limited tryptic proteolysis of recombinant pneumococcal DivIB. Residue 336 corresponds to the C terminus of the β domain defined by the tryptic digestion of DivIB from *G. stearothermophilus* (43).

Strains harboring resistance determinants were routinely grown in the presence of kanamycin (500 mg liter<sup>-1</sup>) or chloramphenicol (4.5 mg liter<sup>-1</sup>). Antibiotics were omitted for the determination of growth curves. For growth in CD broth, the inocula were washed three times with CD medium prior to inoculation. Alternatively, 4.5-ml cultures were grown in triplicates in 12-well cell culture plates (Cellstar; Greiner Bio-One) sealed with a transparent film (Manco Crystal Clear sealing tape). Plates were incubated at 37°C, and the turbidity was monitored at 595 nm in a Fluostar reader (BMG optima). Competent cells were generated and transformations were carried out as described previously (13).

**Plasmids and DNA constructions.** The plasmids and primers used in this work are listed in Tables 1 and 2. To construct *divIB*, *divIC*, and *ftsL* null strains, competent cells of the R6 strain were transformed with PCR products consisting of a chloramphenicol resistance (*cat*) cassette flanked by fragments, about 500 bp long, homologous to the regions adjacent to each target gene, according to the method of Fadda et al. (21), and plated onto chloramphenicol-containing Columbia blood agar. Transformants were further isolated twice on chloramphenicol plates. Insertion in the *divIB* gene was checked by the length of a PCR product obtained with the external primers divIB-F0 and divIB-R7. The absence of DivIB was checked by immunoblotting.

To construct DivIB-, DivIC-, and FtsL-overexpressing strains, the respective genes were inserted in the chromosomes of the R6 and B2 strains downstream of the *ami* operon, under the control of a maltose-induced promoter (*P<sub>M</sub>*) and with a kanamycin resistance gene, by transformation with ligation mixtures of NcoI/BamHI-digested PCR products and pCEP plasmid (26). The insertions were checked by PCR with the primers amiF-F1 and treR-R, and the inserted genes were sequenced.

Alternatively, *divIB*, or alleles for truncated variants (*divIBΔγ*, *divIBE222A*, *divIBS337\**, *divIBΔβγ*, and *divIBΔec*) were introduced at the *bgaA* locus under the control of a fucose-regulated promoter (*P<sub>fsc</sub>*) with a kanamycin resistance gene, using the pLIM100 plasmid (L. Roux and A. Zapun, unpublished data). The *divIB* PCR product (primers divIB-F and divIB-R) was introduced as a NdeI

and BamHI fragment into pET30b (Novagen). The alleles coding for truncated proteins were obtained by the introduction of stop codons using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the primers described ●●●. The variant genes obtained were subcloned into plasmid pLIM100 with NdeI and BamHI restriction enzymes. All plasmids were checked for the desired mutations by DNA sequencing.

**Evaluation of protein stability in the *divIB*-deleted strain.** Protein expression was inhibited in exponentially growing cultures in TH medium at an optical density at 600 nm of 0.3 by the addition of erythromycin (40 mg liter<sup>-1</sup>). Aliquots were withdrawn after various time interval, cells were immediately harvested, and pellets were resuspended in 100 μl of lysis buffer (Cell Lytic [Sigma] supplemented with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 190 U liter<sup>-1</sup> DNase, 10 mg liter<sup>-1</sup> lysozyme, and Complete protease inhibitor cocktail [Roche]) and incubated 15 min at room temperature prior to the addition of 40 μl of reducing XT sample buffer (Bio-Rad) and boiling for 3 min. Samples (adjusted according to the optical density of the culture) were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 4 to 12% gradient Criterion gels (Bio-Rad) and immunoblotting.

**Optical microscopy.** For morphological observations using phase-contrast microscopy, 50 μl of exponentially growing culture was deposited on a slide and briefly heated over a flame before the overlaying of 50 μl of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2 mg liter<sup>-1</sup> of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and mounting. Samples were examined with an Olympus BX61 microscope equipped with a UPFLN 100× O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image processing was performed using the Volocity software package. Cell measurements and analyses were performed with NIH ImageJ software version 1.36b (40).

**Electron microscopy.** For whole-cell transmission electron microscopy (TEM), bacteria were negatively stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate using the mica floatation technique. Briefly, 4 μl of bacteria at an optical density of 0.3, washed twice in PBS, was applied to the edge of a 5-mm<sup>2</sup> piece of carbon-coated mica and allowed to infiltrate between the carbon and mica. After approximately 30 s,

AQ: C



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Genotype	Description	Source or reference
<b>Strains</b>			
R6	Wild type	Noncapsulated D39 derivative	Laboratory stock
R61	R6 <i>ami::P<sub>M</sub>-divIB</i> , Kan <sup>r</sup>	R6 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>divIB</i> PCR fragment, Kan <sup>r</sup>	This study
R62	R6 <i>ami::P<sub>M</sub>-divIC</i> , Kan <sup>r</sup>	R6 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>divIC</i> PCR fragment, Kan <sup>r</sup>	This study
R63	R6 <i>ami::P<sub>M</sub>-ftsL</i> , Kan <sup>r</sup>	R6 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>ftsL</i> PCR fragment, Kan <sup>r</sup>	This study
R62X5204	R6 <i>pbp2x<sub>5204</sub></i>	R6 transformed with <i>pbp2xof</i> strain 5204	8
B2	R6 <i>divIB::cat</i>	Cam <sup>r</sup>	This study
B21	R6 <i>divIB::cat ami::P<sub>M</sub>-divIB</i>	B2 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>divIB</i> PCR fragment, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B22	R6 <i>divIB::cat ami::P<sub>M</sub>-divIC</i>	B2 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>divIC</i> PCR fragment, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B23	R6 <i>divIB::cat ami::P<sub>M</sub>-ftsL</i>	B2 transformed with a ligation mixture of NcoI/BamHI-digested pCEP and <i>ftsL</i> PCR fragment, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B24	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIB</i>	B2 transformed with pLIM101, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B25	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIBΔγ</i>	B2 transformed with pLIM102, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B26	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIBE222A</i>	B2 transformed with pLIM103, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B27	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIBΔβγ</i>	B2 transformed with pLIM104, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B28	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIBS337*</i>	B2 transformed with pLIM105, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B29	R6 <i>divIB::cat bgaA::P<sub>fcsk</sub>-divIBΔec</i>	B2 transformed with pLIM106, Cam <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	This study
B22X5204	R6 <i>divIB::catpbp2x<sub>5204</sub></i>	R62X5204 transformed with <i>divIB::cat</i> PCR product, Cam <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmids</b>			
pCEP		Expression platform at <i>ami</i> locus with maltose-induced promoter	26
pLIM100		Expression platform at <i>bgaA</i> locus with fucose-induced promoter	L. Roux and A. Zapun, unpublished data
pLIM101		Modification of pLIM100 for expression of DivIB	This study
pLIM102		Modification of pLIM100 for expression of DivIBΔγ	This study
pLIM103		Modification of pLIM100 for expression of DivIBE222A	This study
pLIM104		Modification of pLIM100 for expression of DivIBΔβγ	This study
pLIM105		Modification of pLIM100 for expression of DivIBS337*	This study
pLIM106		Modification of pLIM100 for expression of DivIBΔec	This study

the carbon-mica was introduced into a well containing 500 μl of uranyl acetate and the carbon sheet was allowed to float on the stain for 30 s. A copper grid was placed on the carbon, and the specimen was picked up with tweezers. The excess liquid was removed with blotting paper, and the specimen was air dried.

For TEM of ultrathin sections, exponentially growing cells were centrifuged at 7,000 × g for 3 min. The pellets were fixed for 1 h at room temperature in a solution of 2% glutaraldehyde in TEM buffer (100 mM sodium cacodylate, pH 6.8). Fixed cells were washed twice in TEM buffer and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in TEM buffer. The dehydration was performed using ethanol, and the cell pellets were embedded in Epon before sectioning. Thin sections were double stained with uranyl acetate and lead citrate. Specimens were examined using a Philips CM12 electron microscope equipped with a LaB6 filament operating at 100 kV.

For scanning electron microscopy, cultures were rapidly chilled, washed in 10 mM phosphate (pH 7.0), and fixed in 1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde in 0.15 M sodium cacodylate buffer for 4 h at room temperature. Fixed cells were washed with PBS, transferred onto a circular cover glass, and dehydrated using increasing concentrations of acetone; this was followed by critical-point drying using CO<sub>2</sub>. Samples were then coated with platinum using an Emitech 575 turbo sputtering apparatus and examined with an FE Hitachi S4000 scanning electron microscope operating at 15 to 20 kV.

**Susceptibility to antimicrobials.** The MICs of penicillin G, cefotaxime, ofloxacin, and gentamicin were determined using the Etest method. Liquid overnight cultures were plated at a 0.5 McFarland standard on Columbia 4% blood agar, Etest strips (AB Biodisk) were laid on the plates, and the MICs were read after 18 to 24 h of incubation.

The effect of penicillin G, cefotaxime, and sodium azide on liquid cultures in TH broth at 37°C was monitored by the optical density at 600 nm. The antimicrobials were added once the cultures had reached a density of 0.3. The β-lactams were added at fourfold their MICs in liquid broth (0.68 mg liter<sup>-1</sup> and 0.34 mg liter<sup>-1</sup> for R6 and B2, respectively), and NaN<sub>3</sub> was at 0.2%.

## RESULTS

**Pneumococcal *divIB* is not essential for growth in rich medium.** To test whether *divIB*, *divIC*, and *ftsL* are required for cell division in *S. pneumoniae*, we tried to inactivate the three genes individually. The R6 laboratory strain was transformed with a PCR product consisting of a chloramphenicol resistance (*cat*) cassette flanked by extensions that are homologous to the regions 3' and 5' of each target gene. We were able to obtain insertion-deletion mutations in the *divIB* gene (about 50 colonies per transformation) but not in either *ftsL* or *divIC*, despite numerous attempts. Therefore, FtsL and DivIC appear to be essential in *S. pneumoniae*, but DivIB does not. The correct insertion of the *cat* cassette at the *divIB* locus was confirmed by PCR with external primers. In *divIB*-deleted strains, codons 100 through 297 of *divIB* are replaced by a stop codon and the *cat* cassette. The first 100 codons of *divIB* encode part of the N-terminal cytoplasmic region with a sequence unlikely to adopt a folded conformation. In the absence of the transmembrane segment, this N-terminal fragment of DivIB, if expressed, is unlikely to be functional. Five clones were examined for their growth rate and morphology by phase-contrast microscopy. One representative clone, termed B2, was chosen for further characterization.

Immunoblotting confirmed the absence of wild-type DivIB



TABLE 2. Primers used in this study

Function and primer name	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Restriction site
Deletion of <i>divIB</i>		
divIB-F1	GCTCTTGGCGATAGCAAAAT	
divIB-R2	TCAAACAAATTTTCATCAAGCTTCTTTAGACTCTGGTTCTTCTTT	
divIB-F3	AAAGAAGAACCAGAGTCTAAAGAAGCTTGATGAAAATTTGTTTGA	
divIB-R4	GTCAATCGAATTAATCGGATGTTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG	
divIB-F5	CCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAACATCCGATTTAATTCGATTGAC	
divIB-R6	CCCCAAAAATTCACCATCTG	
Deletion of <i>divIC</i>		
divIC-F1	AGACCGTTTTTGGAGAATACCC	
divIC-R2	TCAAACAAATTTTCATCAAGCTTGTATTCAATTTGAATAAAAAGAATT	
divIC-F3	AATTCCTTTTATTCAAATGAATACAAGCTTGATGAAAATTTGTTTGA	
divIC-R4	TTGATACTGAGTTTGCAAGTCTGTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG	
divIC-F5	CCGGGGGATCCACTAGTTCTAGACAGACTTGCAAACTCAGTATCAA	
divIC-R6	TCATTTCGCATAAACAGGAACC	
Deletion of <i>ftsL</i>		
ftsL-F1	AAGTGAAGCCGATTGAGACAA	
ftsL-R2	TCAAACAAATTTTCATCAAGCTTGTTTAAGTTGCATCTGTAGTAT	
ftsL-F3	ATACTACAGATGCAACTTAAACAAGCTTGATGAAAATTTGTTTGA	
ftsL-R4	CTTGCTTGGCATCGTCCAATTTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG	
ftsL-F5	CCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAAATTTGGACGATGCCAAGCAAG	
ftsL-R6	TTGTCCGTTTGGGTAACACTACG	
Gene amplification for ligation into pCEP		
divIB-D1	CTGCCATGGCGTCAAAAAGATAAGAAAAATGAGG	NcoI
divIB-R	CGCCCTCGAGGATCCACTAGTCTAGCGACGCGATGAACGC	BamHI
divIC-D1	CTGCCATGGCGTCTAAAAATATTGTACAATTGAATAATTC	NcoI
divIC-R	CGCCCTCGAGGATCCACTAGTTCACCTTTGAAGCAAGTCAGG	BamHI
ftsL-D1	CTGCCATGGCGGCAGAAAAAATGGAAAAAACAGG	NcoI
ftsL-R	CGCCCTCGAGGATCCACTAGTTTACTCCGCTATTCTAATATTTTCATTG	BamHI
Gene amplification for ligation into pET-30b(+)		
divIB-F	GGTGCCATATGTCGACGTCAAAAAGATAAGAAAAATGAGGACAAAGAAACC	NdeI
External primer		
divIB-F0	GAAAGAAGTAACAGAGCGCTAC	
divIB-R7	GATACCTGTTGCAAGTCCAGC	
amiF-F1	CCGAATTAGCACGTTATCAAAAAAGG	
treR-R	CGCCAAATCGCTGAGCAG	
Mutagenesis of <i>divIB</i> in pET30b- <i>divIB</i>		
divIB E222A-F	GGTCAAGGCATATGATATTGTGGCC	
divIB E222A-R	GGCCACAATATCATATGCCTTGACC	
divIB Δγ-F	GGAAAAAGCCTAGCTAGCGGCCAAGG	NheI
divIB Δγ-R	CCTTGGCCGCTAGCTAGGCTTTTTCC	NheI
divIB S337*-F	GCCACAATTGTCAGAACCGTGAGTGGTGC	
divIB S337*-R	CGACCACTCACGGTCTGACAATTGTGGC	
divIB Δβγ-F	CCAACTAAGTTCACTATCTAGATCAAGG	XbaI
divIB Δβγ-R	CCTTGATCTAGATAGTGAACCTAGTTGG	XbaI
divIB Δec-F	CAGTCCTTAATCGATCATGAAAGATATTGC	Clal
divIB Δec-R	CGAATATCTTTCATGATCGATTAAAGGACTG	Clal

<sup>a</sup> Restriction sites are underlined.

protein in B2 (not shown). The growth rate of strain B2 in TH medium, monitored by the culture turbidity, was comparable to that of the parent strain R6 (mass doubling time of 45 min measured in 12-well plates) during the exponential phase, and the maximum densities were similar. However, strain B2 lysed sooner than R6 following the stationary phase (not shown). *B. subtilis* deleted of *divIB* does not divide at high temperature, and we examined the growth of pneumococcus at 40°C, the

maximum temperature that supports physiological growth of *S. pneumoniae* without morphological changes (D. Fadda and O. Massidda, unpublished data). The growth rates of R6 and B2 were similar and were higher at 40°C than at 37°C.

**The absence of DivIB affects the morphology of pneumococcus.** Examination by phase-contrast microscopy revealed that strain B2 formed longer and more abundant chains than the parental R6 strain. To evaluate this phenotype quantitatively,

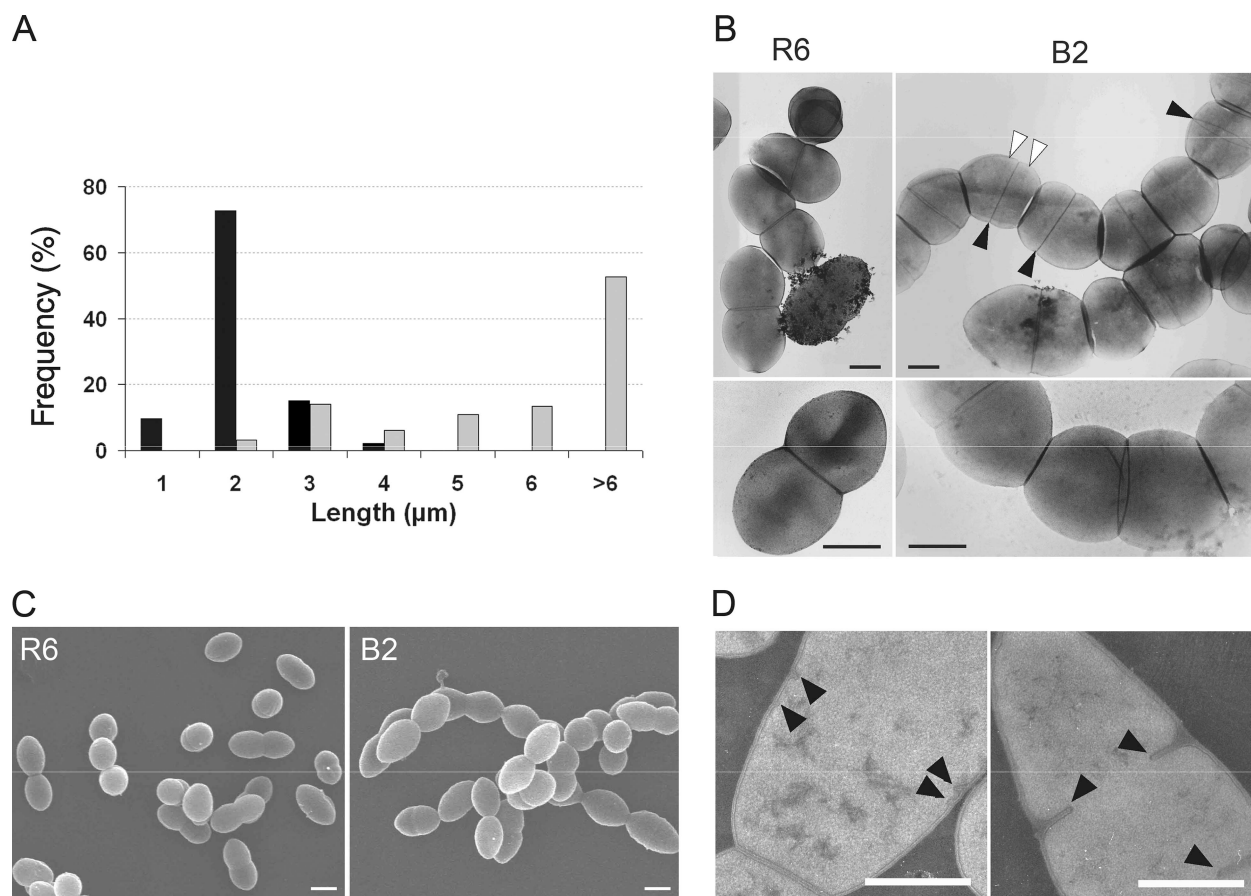


FIG. 2. Phenotypes of the  $\Delta divIB$  mutant. Bacteria were grown in TH broth at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> to an optical density at 600 nm of 0.45 and prepared for microscopy. (A) Chain length distribution of strains R6 (black) and B2 (gray) (165 measurements each). (B) Transmission electron micrographs of negatively stained pneumococci (images were taken at nominal magnifications of  $\times 10,000$  or  $\times 22,000$  [top and bottom, respectively]). White arrowheads indicate equatorial rings, and black arrowheads point to septa. (C) Scanning electron micrographs. (D) Transmission electron micrographs of negatively stained thin sections of B2. Arrowheads point to nascent septa. Bars, 0.5  $\mu$ m.

the chain length distribution was determined (Fig. 2A). While the average chain length of the wild-type R6 was 1.6  $\mu$ m (corresponding mostly to diplococci) at an optical density at 600 nm of 0.45, most chains of B2 were longer than 6  $\mu$ m in the same conditions. The average chain length seemed to drop at the inoculation of a fresh culture and increase with cell density. The increasing chain length would explain why the number of CFU increased more slowly than the total cell mass monitored by turbidity (not shown).

The morphology of most cells in B2 chains appeared normal as observed by phase-contrast light microscopy, scanning electron microscopy, and negative-stain TEM (Fig. 2B and C). Chains consist of linked diplococci and thus result likely from a defect in the last steps of cell separation. The transmission electron micrographs in Fig. 2B require some comments, as they permit the unusual visualization of the cell surface in transparency. The equatorial annular outgrowths are visible on some cells, as well as rings marking the outer edge of septa. The position of septa can be distinguished from cell-cell interfaces that appear as dark discs due to the trapping of dye between cells.

Besides morphologically normal cells, aberrantly shaped cells were also found in B2 cultures. They probably repre-

sented fewer than 5% of all cells, but they were difficult to quantify as there is a continuum of forms between normal cells and very clearly enlarged cells. Electron micrographs of negatively stained thin sections of such larger and deformed cells revealed the presence of multiple septa (Fig. 2D).

**Pneumococcal *divIB* is essential in CD medium, and growth is rescued by an additional copy of *ftsL*.** In CD medium at 37°C, the R6 strain grew with a mass doubling time comparable to that in rich medium (45 min) after a long lag phase of about 10 hours following inoculation. In contrast, strain B2 did not grow in CD medium whereas it grew in TH medium, showing that *divIB* is essential under these growth conditions (Table 3). Addition of L-asparagine or L-tyrosine (20 mg liter<sup>-1</sup>) did not restore growth, nor did the addition of 1% NaCl. Confirming that the washing steps with CD medium did not kill B2, growth resumed following inoculation of TH medium. Complementation of B2 by insertion of *divIB* at the *ami* or *bgaA* locus restored growth in CD medium and the wild-type morphology, that is, a chain length shorter than 2  $\mu$ m corresponding mostly to diplococci (Table 3; see Fig. 4). When inserted downstream of the *ami* operon, *divIB* was under the control of a maltose-inducible promoter (26). In the absence of the MalR repressor on a multicopy plasmid, this promoter is known to cause ex-

TABLE 3. Introduction of *divIB*, *divIC*, and *ftsL* at the *ami* locus in strains R6 and B2

Parental strain	Genotype	Growth <sup>a</sup> in:		Average chain length (μm) <sup>b</sup> in:	
		CD medium	TH medium	CD medium	TH medium
R6	Wild type	+	+	1.5	1.6
	<i>ami::P<sub>M</sub>-divIB</i>	+	+	1.6	1.9
	<i>ami::P<sub>M</sub>-divIC</i>	+	+	1.4	1.9
	<i>ami::P<sub>M</sub>-ftsL</i>	+	+	1.4	3.3
B2	<i>divIB::cat</i>	—	+	—	6.6
	<i>divIB::cat ami::P<sub>ftsK</sub>-divIB</i>	+	+	1.4	1.8
	<i>divIB::cat ami::P<sub>ftsK</sub>-divIC</i>	—	+	—	4.2
	<i>divIB::cat ami::P<sub>ftsK</sub>-ftsL</i>	+	+	3.4	6.5

<sup>a</sup> Growth was monitored at 590 nm in 12-well plates. +, doubling time of about 45 min; —, absence of growth for 35 h.

<sup>b</sup> Strains were cultivated to an optical density at 600 nm of between 0.3 and 0.5, and 200 particles were measured for each strain.

pression even without inducer (26). DivIB was slightly overexpressed in R6, with or without added maltose, as estimated by immunoblotting (not shown). In B2 complemented at the *ami* locus, the amount of DivIB produced in the absence of maltose was somewhat lower than in the wild-type R6 strain but was sufficient to restore wild-type morphology and growth in defined medium. With the aim of obtaining a lower basal expression level of DivIB, *divIB* was inserted at the dispensable *bgaA* locus (52) under the control of a fucose-inducible promoter (10, 36). The expression of DivIB in the B2 strain in the presence of fucose was over 10-fold greater than the wild-type level, as judged by immunoblotting. In the absence of fucose the amount of DivIB was comparable to that in wild-type R6, and the wild-type phenotypes were also restored. Addition of sucrose or glucose did not significantly reduce the basal levels of expression of DivIB with either promoter. It was therefore impossible to reduce the expression of DivIB enough to observe the fate of cells following depletion of DivIB.

DivIB forms a complex with DivIC and FtsL (6, 16, 37). To test whether overexpression of DivIC or FtsL could compensate for the absence of DivIB, the *divIC* and *ftsL* genes were introduced downstream of the *ami* locus under the control of the maltose-induced promoter in B2 and in R6 for a control. The additional copy of *ftsL* rescued the growth of B2 in CD broth. However, the wild-type morphology was not restored by the additional *ftsL* copy in either TH or CD medium (Table 3). Surprisingly, the presence of an additional copy of *ftsL* caused a moderated chaining of R6 in TH but not in CD medium. In contrast to *ftsL*, the additional copy of *divIC* did not rescue B2 growth in CD medium, nor did it affect the phenotype of R6 (Table 3). Despite the additional gene, no measurable modification of the amount of FtsL or DivIC was observed by immunoblotting in either strain, in the absence or the presence of maltose.

**Destabilization of FtsL in the absence of DivIB.** The results above highlight a functional link between FtsL and DivIB. Moreover, in *B. subtilis*, the proteolysis of FtsL in vivo is influenced by DivIB (14). These observations prompted us to look for effects of the absence of DivIB on the degradation of its partners FtsL and DivIC and other proteins involved in cell

division or cell wall synthesis. Following the addition of the translation inhibitor erythromycin at the experimentally determined MIC where no lysis occurred, the amounts of various proteins in R6 and B2 were evaluated by immunoblotting (Fig. 3). In the absence of protein synthesis, the amount of FtsL in B2 decreased drastically after 60 min and it was not detected after 120 min, whereas it remained constant in R6 for 150 min (Fig. 3G). No important effect of the absence of DivIB on the stability in vivo of FtsK, PBP2x (FtsI), PBP1a, DivIVA, FtsZ, or DivIC was observed. The levels of these proteins remained nearly constant for 150 min following inhibition of protein synthesis, with the possible exception of PBP2x, which may show a slight decrease.

**Functional analysis of the three extracellular domains of DivIB.** To investigate the functions of the various domains of DivIB in pneumococcus, we took advantage of the *divIB* null mutant and the expression platform at the *bgaA* locus to conduct complementation experiments. Various forms of DivIB truncated from the C terminus were thus expressed, and the growth and morphological phenotypes were examined. As stated above, expression of full-length DivIB restored both wild-type morphology and growth in CD medium. The empty expression platform, which consists of the fucose-induced promoter and a kanamycin resistance cassette, did not affect either growth or morphology of either strain (Fig. 4). Expression of the diverse truncated forms of DivIB did not affect the R6 strain, which also expresses the endogenous full-length DivIB.

To probe the function of the  $\gamma$  and  $\beta$  domains, three truncated forms, DivIB $\Delta\gamma$ , DivIBS337\*, and DivIB $\Delta\beta\gamma$ , were created. In DivIB $\Delta\gamma$ , the  $\gamma$  domain of DivIB was truncated in order to leave a  $\beta$  domain in accordance with our results from trypsin proteolysis (S. Masson and A. Zapun, unpublished data) and sequence analysis using alignments and hydrophobic

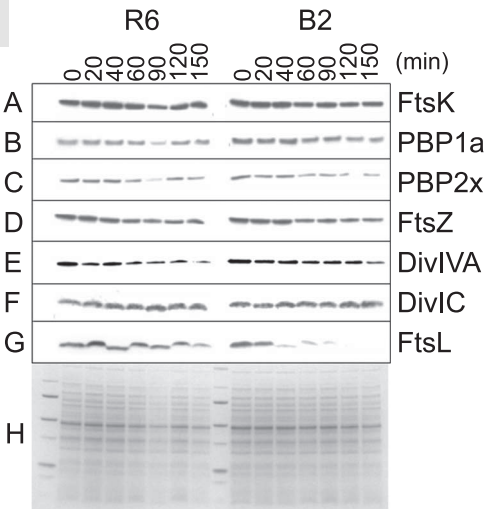


FIG. 3. Stability in vivo of some division proteins in the absence of DivIB. Strains R6 and B2 were grown in TH broth to an optical density at 600 nm of 0.3 prior to addition of erythromycin (40 μg/ml) to inhibit protein synthesis. Aliquots withdrawn after the time intervals indicated were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. (A to G) Immunoblots with sera against the proteins indicated on the right. (H) Corresponding Coomassie blue-stained gel of total cell lysates.

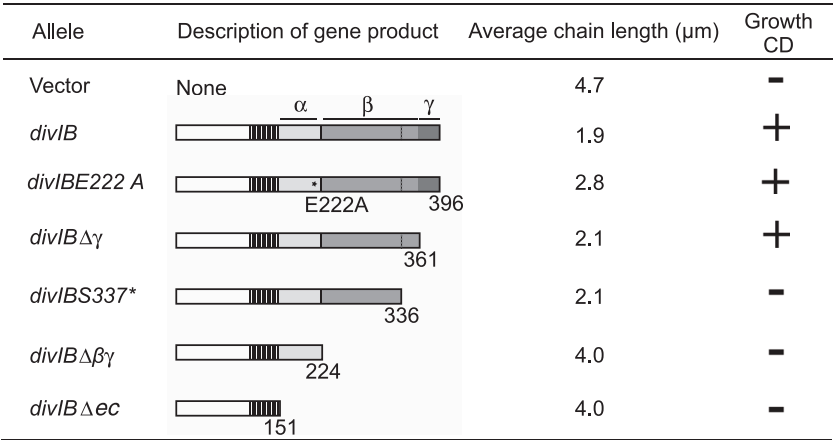


FIG. 4. Functional characterization of the DivIB domains. The cytoplasmic N-terminal domain is in white. The transmembrane segment is hatched. The three domains of the extracellular region are in various shades of gray. Alleles encoding DivIB variants were introduced in B2 at the *bgaA* locus. Exponentially growing cultures were analyzed by phase-contrast microscopy. For each strain, 200 particles were measured. Growth in CD medium was monitored in 12-well plates at 37°C. +, mass doubling of about 45 min. -, absence of growth at 35 h following the inoculation.

cluster analysis (Fig. 1) (37, 49). In DivIBS337\*, the protein DivIB was truncated further in order to match the C terminus of the β domain, as defined for the protein from *Geobacillus stearothermophilus* (43). DivIBΔβγ retains the α domain, whereas the whole extracellular domain is absent from *divIBΔec*. The point mutant DivIBE222A was created to probe the role of this highly conserved residue at the junction of the α and β domains. With the exception of DivIBΔec, since antibodies were raised against the extracellular soluble part of DivIB, the expression of all the truncated forms was checked by immunoblot.

Results of the complementation experiments are given in Fig. 4. The nonconserved γ tail (residues 362 to 396) appears to be dispensable. However, residues 337 to 361, which form the C terminus of the β domain, are necessary to restore growth in CD medium but are not required to prevent chain formation in rich medium. Further truncations did not rescue either the growth in CD medium or the morphology phenotypes.

Replacement of the conserved glutamate 222 by an alanine permitted growth in defined medium but only slightly reduced the chain length in rich medium.

**Cells with DivIB depleted are more susceptible to β-lactam antibiotics.** To test whether DivIB might be involved in cell wall synthesis, we measured the impact of the inactivation of *divIB* on the susceptibility to β-lactam antibiotics, which target the penicillin-binding proteins that assemble the peptidoglycan. B2 was more susceptible than the parental R6 strain to penicillin G and cefotaxime by a factor of 2 (Table 4). As the

wild-type R6 strain is itself susceptible to β-lactams, these results concern minute concentrations of antibiotics. We therefore looked at the consequence of disrupting *divIB* in a derivative of the R6 strain with a reduced susceptibility to β-lactams due to the expression of a variant of PBP2x of clinical origin (strain 5204) that has a low affinity for β-lactams (R62X5204). In the resulting strain (termed B22X5204), the susceptibility to penicillin G and cefotaxime was increased fourfold (Table 4). The disruption of *divIB* had no effect on the susceptibility to ofloxacin, a fluoroquinolone that interferes with DNA replication and transcription, and to gentamicin, an aminoglycoside that inhibits protein synthesis.

Penicillin G and cefotaxime have lytic and nonlytic actions on pneumococcus, respectively. To test whether the deletion of *divIB* had a general effect on the susceptibility to lysis, we examined the fate of cultures following the addition of these β-lactams at fourfold their MICs during the exponential growth phase. Although the lysis induced by penicillin G was faster for B2 than for R6, cefotaxime did not cause lysis of either strain (not shown). The electron transport chain inhibitor azide (NaN<sub>3</sub>) at 0.2% caused the rapid growth arrest of both the R6 and B2 strains without causing lysis (not shown). These results indicate that the greater susceptibility of B2 to β-lactams does not result from a gross defect of the peptidoglycan causing a severe fragility of the cell wall.

DISCUSSION

**Essentiality of DivIB and stabilization of FtsL.** The gene *divIB/ftsQ* is required for correct cell division in the rod-shaped bacteria *E. coli* and *B. subtilis*, but these bacteria differ regarding the essentiality of this gene. Unlike *ftsQ* in *E. coli*, *divIB* in *S. pneumoniae* is dispensable under some conditions, like in *B. subtilis*. In contrast, *ftsL* and *divIC/ftsB* are essential in the three organisms. Although division of pneumococcus can occur without *divIB* in the TH rich medium, longer chains of cells are formed, and a small fraction of cells are malformed with multiple septa (Fig. 2). Thus, pneumococcal *divIB* appears to influence a late stage of cell division, chain dispersion, but is

TABLE 4. Effect of *divIB* deletion on antimicrobial resistance

Strain	MIC (mg liter <sup>-1</sup> )			
	Cefotaxime	Penicillin G	Ofloxacin	Gentamicin
R6	0.032	0.032	1.5	24
B2	0.015	0.015	1.5	24
R62X5204	0.38	0.094	1.5	24
B22X5204	0.094	0.023	1.5	24



also involved at an early stage of the division for proper septum formation. The defect in septation is possibly responsible for the failure to grow in defined medium.

Growth in defined medium was restored by an additional copy of *ftsL* (Table 3), although this second gene did not increase the amount of FtsL in exponentially growing cells (in TH medium). The amount of FtsL is not affected by the presence or absence of *divIB*, with or without an additional copy of *ftsL*. However, when protein synthesis is inhibited, the amount of FtsL drops dramatically in the absence of DivIB, whereas it remains constant in its presence (Fig. 3). These observations suggest that DivIB protects FtsL from degradation, as the absence of DivIB increases the turnover of FtsL. Indeed, as a normal amount of FtsL is maintained in the culture even in the absence of DivIB when translation can proceed, it is likely that the synthesis of FtsL is increased to compensate for its faster degradation.

When the defined medium is inoculated with cells grown previously in TH medium, growth resumes only after a lag phase of several hours. This lag probably allows for the readjustment of the metabolic pathways to the new conditions. It is possible that while cells undergo this adaptation, the level of FtsL drops below a critical threshold in the mutant, because its rate of synthesis may be insufficient to compensate for its faster degradation in the absence of DivIB. The additional copy of *ftsL* may generate enough FtsL synthesis to overcome this possible critical step during the lag phase due to the changing conditions.

The hypothesis discussed above implies that the essentiality of DivIB is mediated by that of FtsL. The relationship between DivIB and FtsL in *S. pneumoniae* resembles that in *B. subtilis*, where the essentiality of *divIB* at high temperature could be attributed to the reduced amount of FtsL (14, 15). In *E. coli*, in contrast, the essentiality of *ftsQ* appears to result not from protecting FtsL but rather from stabilizing the interaction between FtsL and FtsB, which do not associate and are not localized at the division site in the absence of FtsQ (6).

The reason underlying the defect in chain dispersion, in contrast, does not appear to involve FtsL. Indeed, a second copy of *ftsL* does not restore the normal cell separation. Chain dispersion depends on the action of peptidoglycan hydrolases, so that a defect in cell separation may result from a modified peptidoglycan that is less prone to degradation or from a deficit in the recruitment or activation of one or more hydrolases at the division site. Interestingly, the expression of a truncated form of DivIB that did not restore growth in defined medium, and is probably unable to interact with FtsL (see below), could restore normal chain length.

**Domains of DivIB.** The extracytoplasmic part of DivIB consists of three domains (Fig. 1). We took advantage of the possibility of complementing the deleted strain to investigate the relative roles of these domains in *S. pneumoniae* (Fig. 4). Truncations were designed to produce C termini corresponding to domains resulting from proteolytic cleavage. The sequence of the C-terminal tail of DivIB or FtsQ (i. e., residues further than about 200 to 215 amino acids from the transmembrane segment) is not conserved, is of variable length (sometimes completely absent), and consists mostly of charged and polar residues. The C-terminal tail is therefore likely unimportant. This  $\gamma$  domain of pneumococcal DivIB is unlikely to be

structured and was found to be dispensable for the interaction in vitro with the heterodimer formed by FtsL and DivIC (37). As *divIB* $\Delta\gamma$  restores growth in CD medium and a normal chain length distribution, we conclude that the  $\gamma$  domain is dispensable for the function of DivIB. In contrast, the conserved region of the extracellular domain (i. e., the 200 to 215 residues following the transmembrane segment) is required for normal function, as complementation with a gene encoding DivIB deprived of its complete extracellular domain (*divIB* $\Delta ec$ ) did not modify the phenotype of the deletion strain (Fig. 4). However, we could not check whether this truncated protein was expressed and stable. The conserved region of DivIB can itself be divided in two domains based on the susceptibility to tryptic digestion: an  $\alpha$  domain that was sensitive to degradation and a  $\beta$  domain that was resistant. The existence of these domains is supported by the recently determined crystal structure of FtsQ (49). We found that the *divIB* $\Delta\beta\gamma$  gene, which codes for a protein with an extracellular region containing only the  $\alpha$  domain, did not restore wild-type phenotypes (Fig. 4), indicating that the  $\beta$  domain is required, as was found in *B. subtilis* (51).

An uncertainty exists regarding the C-terminal limit of the  $\beta$  domain. Limited proteolysis of recombinant pneumococcal DivIB produced a  $\beta$  domain reaching to residue 361, which includes the complete C-terminal part of the conserved, folded region, as determined by examination of sequence alignments and hydrophobic cluster analysis. Tryptic digestion of DivIB from *Geobacillus stearothermophilus* resulted in a shorter fragment extending to the corresponding residue 336 in the pneumococcal protein (43). In *B. subtilis*, residues following position 229 were found to include an epitope participating in the septal localization (51). Interestingly, a gene encoding DivIB truncated after residue 336 (*divIB337\**) failed to restore growth in defined medium but corrected the chaining in TH medium, showing that the two defects can be separated (Fig. 4). In *E. coli*, one *ftsQ* mutant was identified, corresponding to a similar truncation of the  $\beta$  domain (the last 29 residues), that is unable to recruit FtsL to the division site (11). Other truncations pointed to residues 250 to 256 of FtsQ for the recruitment of FtsL and FtsB in *E. coli* (24). Also in *E. coli*, amino acids 237 and 252 in the C-terminal part of the  $\beta$  domain were shown to be important for the recruitment of FtsL and FtsB (24, 49). These observations indicate that the C-terminal part of the  $\beta$  domain is necessary for the interaction with FtsL. The failure of *divIB337\** to restore growth in defined medium would then be consistent with the idea that the essentiality of DivIB results from a functional relationship with FtsL.

The most conserved residue in DivIB and FtsQ is a glutamic acid at the junction of the  $\alpha$  and  $\beta$  domains. This glutamate is not required for the septal localization of DivIB in *B. subtilis* (51). To probe its function, the deletion strain was complemented with a gene coding for a protein with the point mutation E222A. The *divIBE222A* gene did restore growth in CD medium but did not prevent chaining in TH medium (Fig. 4), in contrast to *divIB337\** but like an additional copy of *ftsL*. Thus, the conserved junction of the  $\alpha$  and  $\beta$  domains seems to be involved in a function of DivIB that influences a very late stage of the division process, cell dispersion, but is not involved in the essential function of DivIB.

**A possible role of DivIB in cell wall synthesis.** In chains of the *divIB* deletion mutant, diplococcal cells appear to be at-

tached by the tip of their poles, as if only cell dispersal was impaired, much like in a *lytA* or *lytB* mutant. LytA and LytB are peptidoglycan hydrolases participating in or required for cell separation, and a lack of these enzymes results in chaining (17). The formation of chains in the absence of DivIB could be due to a modification of the peptidoglycan composition, making the cell wall less prone to cleavage by hydrolases. However, no important modification in the amounts of the different muropeptides was detected in the *divIB* null mutant (W. Vollmer, personal communication), so if changes are real, they are small or localized.

If the small decrease in the amount of PBP2x observed in the absence of DivIB and protein synthesis (Fig. 3C) turns out to be real, this observation could indicate an interaction between DivIB and PBP2x and support previous data from two-hybrid experiments with the proteins from *B. subtilis* (14, 16). Another observation that could be consistent with a speculative function of DivIB in peptidoglycan synthesis is the increased susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics of the *divIB* deletion mutant (Table 4). The lytic and nonlytic actions of penicillin G and cefotaxime were retained in the *divIB* deletion mutant, implying that the increased susceptibility to  $\beta$ -lactams was probably not the result of a generally increased susceptibility to lysis. No effect of the deletion of *divIB* on the susceptibility to drugs that target DNA or protein metabolism was found. Also, rapid growth arrest caused by azide (a poison of the electron transport chain) did not cause lysis of either the mutant the parental strain. In a strain that exhibits some resistance to  $\beta$ -lactams due to the presence of a low-affinity PBP2x, the absence of DivIB restores susceptibility to cefotaxime and penicillin G. This finding indicates that targeting the function of DivIB provides a way to restore the efficacy of the most tried and tested class of antibacterial drugs, the  $\beta$ -lactams.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by European grant LSMH-CT-EUR-INTAFAR 2004-512138 to T. Vernet's laboratory and by a Ministry of Research ("Allocation de Recherche") grant to A.L.G.

We thank Waldemar Vollmer for the peptidoglycan analysis, as well as Anne Marie Di Guilmi and Daphna Fenel for the electronic microscopy experiments and Isabelle Petit for the partial proteolysis of DivIB.

#### REFERENCES

- Angert, E. R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:214–224.
- Beall, B., and J. Lutkenhaus. 1989. Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. *J. Bacteriol.* **171**:6821–6834.
- Bramkamp, M., L. Weston, R. A. Daniel, and J. Errington. 2006. Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **62**:580–591.
- Briegleb, A., D. P. Dias, Z. Li, R. B. Jensen, A. S. Frangakis, and G. J. Jensen. 2006. Multiple large filament bundles observed in *Caulobacter crescentus* by electron cryotomography. *Mol. Microbiol.* **62**:5–14.
- Buddelmeijer, N., M. E. Aarsman, A. H. Kolk, M. Vicente, and N. Nanninga. 1998. Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescence microscopy in dividing and nondividing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:6107–6116.
- Buddelmeijer, N., and J. Beckwith. 2004. A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.* **52**:1315–1327.
- Buddelmeijer, N., N. Judson, D. Boyd, J. J. Mekalanos, and J. Beckwith. 2002. YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:6316–6321.
- Carapito, R., L. Chesnel, T. Vernet, and A. Zapun. 2006. Pneumococcal beta-lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. *J. Biol. Chem.* **281**:1771–1777.
- Carson, M. J., J. Barondess, and J. Beckwith. 1991. The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J. Bacteriol.* **173**:2187–2195.
- Chan, P. F., K. M. O'Dwyer, L. M. Palmer, J. D. Ambrad, K. A. Ingraham, C. So, M. A. Lonetto, S. Biswas, M. Rosenberg, D. J. Holmes, and M. Zalacain. 2003. Characterization of a novel fucose-regulated promoter (PfcSk) suitable for gene essentiality and antibacterial mode-of-action studies in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**:2051–2058.
- Chen, J. C., M. Minev, and J. Beckwith. 2002. Analysis of ftsQ mutant alleles in *Escherichia coli*: complementation, septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *J. Bacteriol.* **184**:695–705.
- Chen, J. C., D. S. Weiss, J. M. Ghigo, and J. Beckwith. 1999. Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:521–530.
- Chesnel, L., L. Pernot, D. Lemaire, D. Champelovier, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun. 2003. The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J. Biol. Chem.* **278**:44448–44456.
- Daniel, R. A., and J. Errington. 2000. Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol. Microbiol.* **36**:278–289.
- Daniel, R. A., E. J. Harry, V. L. Katis, R. G. Wake, and J. Errington. 1998. Characterization of the essential cell division gene ftsL(yiID) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol. Microbiol.* **29**:593–604.
- Daniel, R. A., M. F. Noiro-Gros, P. Noiro, and J. Errington. 2006. Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. *J. Bacteriol.* **188**:7396–7404.
- De Las Rivas, B., J. L. Garcia, R. Lopez, and P. Garcia. 2002. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**:4988–5000.
- den Blaauwen, T., M. A. de Pedro, M. Nguyen-Disteche, and J. A. Ayala. 2008. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:321–344.
- England, J. C., and J. W. Gober. 2001. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:674–680.
- Errington, J., R. A. Daniel, and D. J. Scheffers. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:52–65.
- Fadda, D., C. Pischedda, F. Caldara, M. B. Whalen, D. Anderluzzi, E. Domenici, and O. Massidda. 2003. Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dcw* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**:6209–6214.
- Ghigo, J. M., D. S. Weiss, J. C. Chen, J. C. Yarrow, and J. Beckwith. 1999. Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol. Microbiol.* **31**:725–737.
- Goehring, N. W., and J. Beckwith. 2005. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**:R514–R526.
- Goehring, N. W., I. Petrovska, D. Boyd, and J. Beckwith. 2007. Mutants, suppressors, and wrinkled colonies: mutant alleles of the cell division gene *ftsQ* point to functional domains in FtsQ and a role for domain 1C of FtsA in divisome assembly. *J. Bacteriol.* **189**:633–645.
- Gorano, A. I., L. Katz, A. M. Breier, C. B. Burge, and A. D. Grossman. 2005. A transcriptional response to replication stress mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:12932–12937.
- Guiral, S., V. Henard, M. H. Laaberki, C. Granadel, M. Prudhomme, B. Martin, and J. P. Claverys. 2006. Construction and evaluation of a chromosomal expression platform (CEP) for ectopic, maltose-driven gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **152**:343–349.
- Guzman, L. M., D. S. Weiss, and J. Beckwith. 1997. Domain-swapping analysis of FtsL, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:5094–5103.
- Karimova, G., N. Dautin, and D. Ladant. 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**:2233–2243.
- Katis, V. L., and R. G. Wake. 1999. Membrane-bound division proteins DivIB and DivIC of *Bacillus subtilis* function solely through their external domains in both vegetative and sporulation division. *J. Bacteriol.* **181**:2710–2718.
- Katis, V. L., R. G. Wake, and E. J. Harry. 2000. Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. *J. Bacteriol.* **182**:3607–3611.
- Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance, and O. Massidda. 2005. Cell division in cocci:

- localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol. Microbiol.* **55**:699–711.
32. Margolin, W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:531–548.
  33. Massidda, O., D. Anderluzzi, L. Friedli, and G. Feger. 1998. Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144**:3069–3078.
  34. McCormick, J. R., and R. Losick. 1996. Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**:5295–5301.
  35. Nanninga, N. 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:110–129.
  36. Ng, W. L., G. T. Robertson, K. M. Kazmierczak, J. Zhao, R. Gilmour, and M. E. Winkler. 2003. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol. Microbiol.* **50**:1647–1663.
  37. Noirclerc-Savoye, M., A. Le Gouellec, C. Morlot, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun. 2005. In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **55**:413–424.
  38. Piette, A., C. Fraipont, T. Den Blaauwen, M. E. Aarsman, S. Pastoret, and M. Nguyen-Disteche. 2004. Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:6110–6117.
  39. Pinho, M. G., and J. Errington. 2003. Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol. Microbiol.* **50**:871–881.
  40. Rasband, W. S. 1997–2007. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
  41. Real, G., S. Autret, E. J. Harry, J. Errington, and A. O. Henriques. 2005. Cell division protein DivIB influences the Spo0J/Soj system of chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **55**:349–367.
  42. Real, G., and A. O. Henriques. 2006. Localization of the *Bacillus subtilis* *murB* gene within the *dew* cluster is important for growth and sporulation. *J. Bacteriol.* **188**:1721–1732.
  43. Robson, S. A., and G. F. King. 2006. Domain architecture and structure of the bacterial cell division protein DivIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:6700–6705.
  44. Rowland, S. L., V. L. Katis, S. R. Partridge, and R. G. Wake. 1997. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **23**:295–302.
  45. Sanchez-Pulido, L., D. Devos, S. Genevrois, M. Vicente, and A. Valencia. 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**:523–526.
  46. Scheffers, D. J., C. Robichon, G. J. Haan, T. den Blaauwen, G. Koningstein, E. van Bloois, J. Beckwith, and J. Luirink. 2007. Contribution of the FtsQ transmembrane segment to localization to the cell division site. *J. Bacteriol.* **189**:7273–7280.
  47. Shiomi, D., and W. Margolin. 2007. Dimerization or oligomerization of the actin-like FtsA protein enhances the integrity of the cytokinetic Z ring. *Mol. Microbiol.* **66**:1396–1415.
  48. Siddiqui, R. A., C. Hoischen, O. Holst, I. Heinze, B. Schlott, J. Gumpert, S. Diekmann, F. Grosse, and M. Platzer. 2006. The analysis of cell division and cell wall synthesis genes reveals mutationally inactivated *ftsQ* and *mraY* in a protoplast-type L-form of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:305–311.
  49. van den Ent, F., T. M. Vinkenvleugel, A. Ind, P. West, D. Veprintsev, N. Nanninga, T. den Blaauwen, and J. Lowe. 2008. Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ. *Mol. Microbiol.* **68**:110–123.
  50. van de Rijn, I., and R. E. Kessler. 1980. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect. Immun.* **27**:444–448.
  51. Wadsworth, K. D., S. L. Rowland, E. J. Harry, and G. F. King. 2008. The divisomal protein DivIB contains multiple epitopes that mediate its recruitment to incipient division sites. *Mol. Microbiol.* **67**:1143–1155.
  52. Zahner, D., and R. Hakenbeck. 2000. The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J. Bacteriol.* **182**:5919–5921.
  53. Zapun, A., T. Vernet, and M. G. Pinho. 2008. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:345–360.







## MATERIEL ET METHODES COMPLEMENTAIRES

### Avertissement aux lecteurs

Ne seront développés dans cette partie que les expériences non décrites ou décrites brièvement dans la publication.

### **I. Automatisation de la mesure des courbes de croissance de *S. pneumoniae***

Pourquoi automatiser la mesure des courbes de croissance de *S. pneumoniae* ? Collecter des données en parallèle pour 12 cultures, à une fréquence élevée et pouvoir collecter des données sur de longues périodes avec plus de flexibilité sont les raisons qui ont motivées cette automatisation. Plusieurs paramètres ont été optimisés pour pouvoir mesurer les courbes de croissances de *S. pneumoniae* de façon automatique. *S. pneumoniae* est un organisme anaérobie facultatif et à tendance à flocculer en phase stationnaire. Le volume de milieu, les paramètres d'agitation, le type de film recouvrant la plaque de culture ont été choisis de façon à permettre une croissance quasiment identique à celle mesurée classiquement en tube 50 ml (Falcon) dans une étuve à 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

Le protocole expérimentale a été le suivant : Le volume de milieu était précisément de 4,5 ml distribué avec un multi-dispenser pour garantir une comparaison de l'absorbance entre les différents puits (hauteur de la colonne liquide = longueur du trajet optique) d'une plaque 12 puits (CELLSTAR, Greiner bio-one). Inoculation au 1/100 avec des stocks glycérolés à DO<sub>600</sub> = 0,3. Un film transparent (Manco™ Crystal Clear Sealing Tape) a été appliqué minutieusement pour éviter tous défauts pouvant altérer le signal. La plaque a été insérée dans le lecteur de plaque (Fluostar Optima BMG Labtechnologies) préalablement préchauffé à 37°C. L'absorbance a été lue à 595nm toutes les 20 minutes après agitation pendant 20 secondes en double orbital avec un rayon de 7mm et ce pendant 40 heures. L'absence d'effet de bord sur la croissance de la souche sauvage R6 a été vérifiée.

## RESULTATS COMPLEMENTAIRES

### I. Délétion de *divIB*

L'insertion par recombinaison-délétion de la cassette *cat* dans le gène *divIB* a été vérifiée par PCR grâce à des oligonucléotides externes (*divIB*-F0 et *divIB*-R7) (Figure 36A). L'absence de DivIB a été vérifiée par immunoblot sur un lysat de B2 (figure 36B).

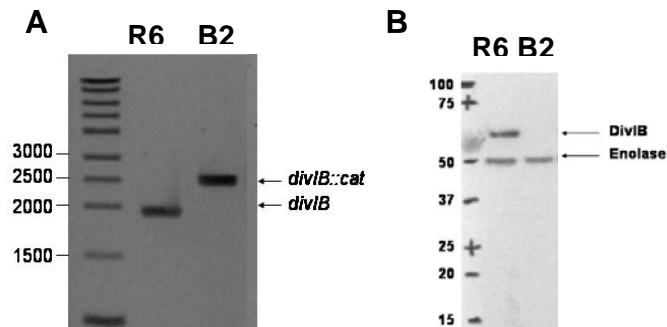


Figure 36. Contrôle de la délétion de *divIB* chez *S. pneumoniae*. A. Gel d'agarose montrant les produits PCR obtenus en utilisant les amorces externe au gène *divIB* (*divIB*-F0 et *divIB*-R7) sur les colonies R6 ou R6 transformé *divIB* ::*cat*. B. Détection de DivIB par western blot avec des anticorps polyclonaux anti-DivIB dilué 1/5000 (dirigés contre la partie extracellulaire) dans des lysats de la souche R6 ou B2 (R6 *divIB* ::*cat*). L'anticorps polyclonal anti-Enolase sert de contrôle positif.

### II. Automatisation de la mesure des courbes de croissance

L'optimisation des paramètres (agitation, film, et volume de culture) a permis d'obtenir un test reproductible sans effet de bord (Figure 37). Les temps de génération étaient comparables à ceux obtenus en tube 50 ml (Falcon), soit environ 45 minutes. Cette automatisation a surtout été pratique pour l'étude de la croissance du pneumocoque en milieu défini car le temps de latence était très long (Figure 38).

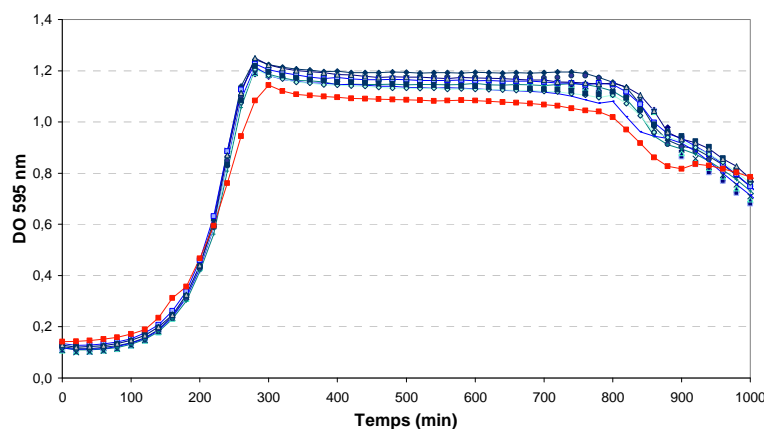


Figure 37. Croissance automatisée de la souche sauvage R6 en milieu riche. Les courbes bleues sont les 12 courbes obtenues pour une expérience. La courbe rouge montre la croissance obtenue un autre jour.

### III. Caractérisation du mutant nul *divIB*

#### III.1 Croissance du mutant nul pour *divIB*

La croissance des souches R6 et mutante a été testée en milieu riche (TH) et en milieu défini (CD) (Figure 38). La souche B2 (nul pour *divIB*) croît de façon similaire à la souche sauvage en milieu riche. Le temps de génération d'environ 45 minutes est comparable pour les deux souches. En revanche, le mutant B2 lyse plus rapidement que le R6.

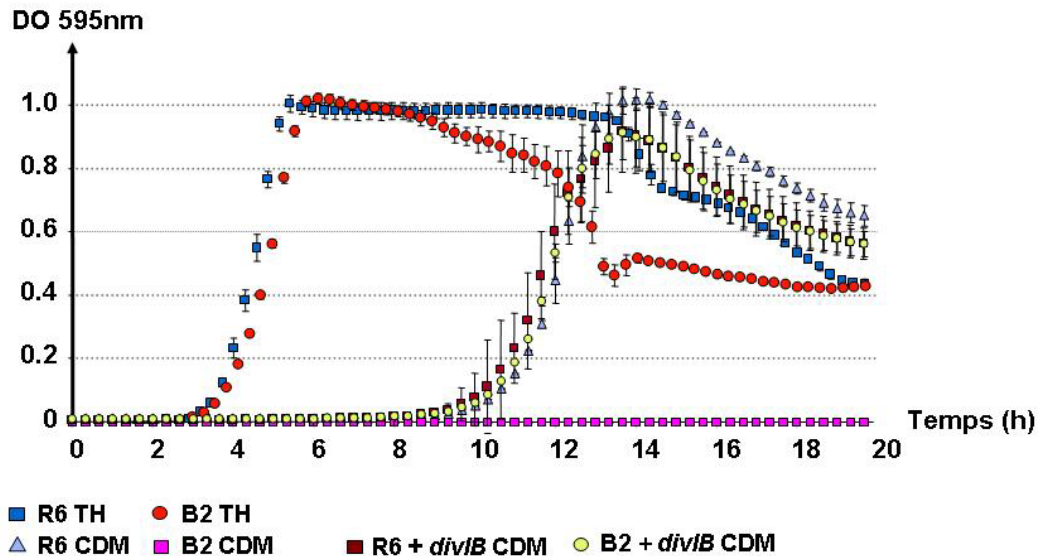


Figure 38. Croissance des souches R6, B2 en milieu riche (TH) et milieu défini (CD). La souche B2 complémentée par l'addition de *divIB* au locus *ami* pousse en CD. L'addition de *divIB* au locus *ami* dans la souche sauvage ne modifie pas la croissance de R6 en CD. Ecarts type donnés pour 3 expériences.

En milieu défini, le mutant B2 ne pousse pas. Le temps de latence observé pour la souche sauvage est plus long qu'en milieu riche. La souche B2 complémentée au locus *ami* en DivIB pousse de façon similaire à la souche sauvage. Par conséquent, l'absence de croissance en milieu défini est bien liée à l'absence de DivIB et non à un effet polaire conséquent à l'insertion de la cassette *cat*.

#### III.2 Morphologie du mutant nul pour *divIB*

La morphologie des souches R6 et B2 a été observée par plusieurs techniques de microscopie. L'observation par microscopie optique à contraste de phase a permis de révéler le phénotype en chaînette du mutant (Figure 39). Ce phénotype est caractéristique d'un défaut de séparation des cellules.

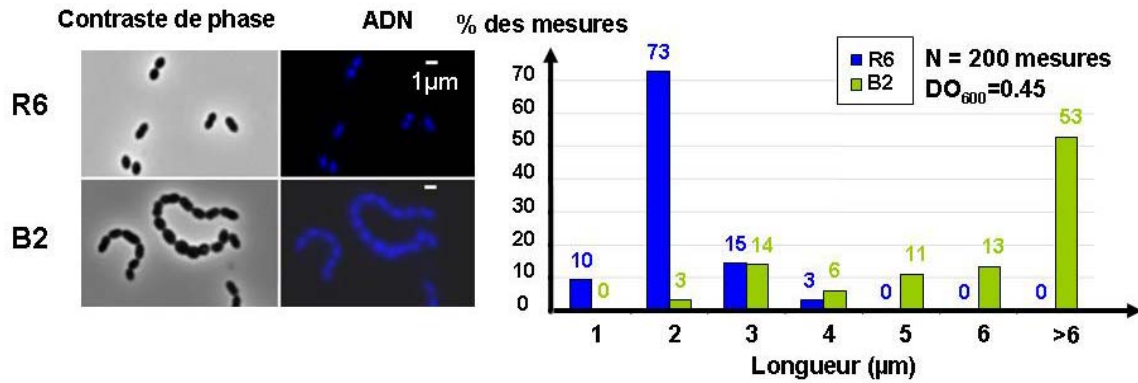


Figure 39. Morphologie des souches R6 et B2 par microscopie optique à contraste de phase. Les cellules sont cultivées en TH jusqu'à  $DO_{600}=0,45$ . Elles sont fixées à la flamme puis après ajout de 50μL de PBS DAPI 0,2mg.L<sup>-1</sup> et montage de la lamelle, sont observées au microscope Olympus BX61 équipé d'un objectif à immersion 100x. La longueur des cellules attachées est mesurée (N=200).

La microscopie électronique à balayage et à transmission ont permis de détailler le phénotype des chaînettes du mutant nul *divIB*. Les chaînettes semblent constituées majoritairement de dicoques de taille et de morphologie normale qui sont liés par l'extrémité des cellules aux dicoques voisins. Quelques cellules sont plus grosses (moins de 5%). En microscopie électronique à transmission en coloration négative, l'anneau de division septal est visible. Les contacts cellule-cellules sont différents de l'anneau de division, car ils apparaissent comme des disques noirs (colorant piégé entre les cellules) (Figure 40A). En microscopie électronique à transmission sur des coupes de cellules, les cellules anormalement grosses présentent de multiples septa (Figure 40B).

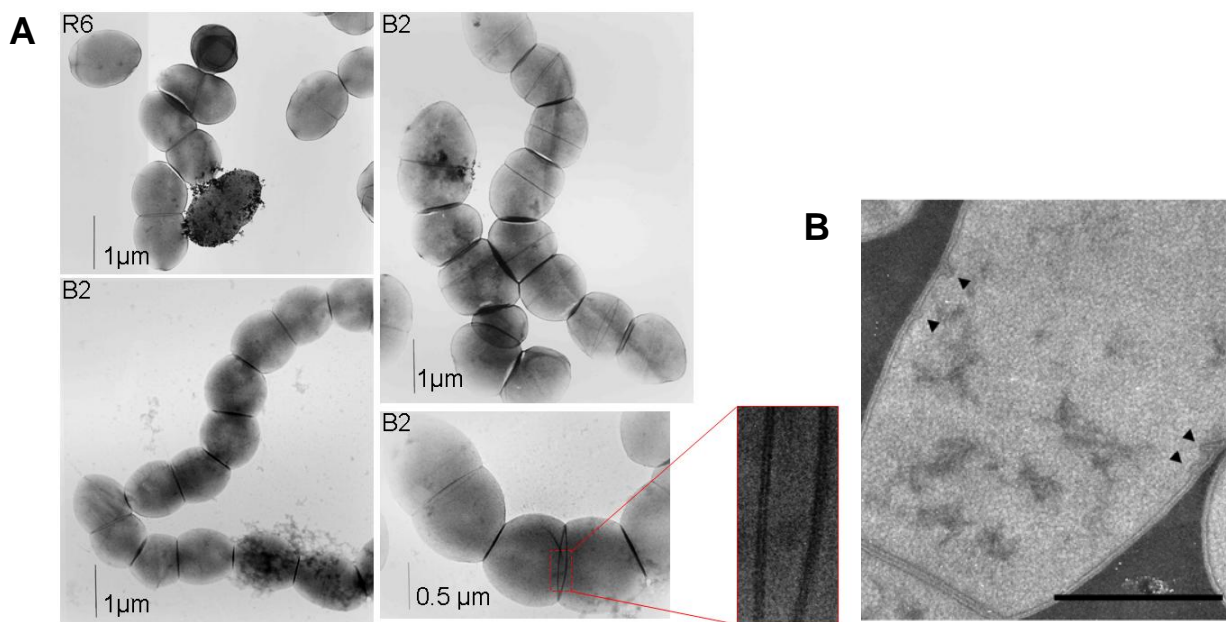


Figure 40. Microscopie électronique des souches R6 et B2. A. Microscopie électronique à transmission en coloration négative des cellules R6 et B2. B. Microscopie électronique sur des coupes d'une cellule B2 anormalement grosse. Les flèches noires pointent vers les septa naissant. Barre = 0,5μm.

## DISCUSSION

*S. pneumoniae* est un pathogène causant la mort de plus d'un million de personnes par an dans le monde. L'émergence de souche multi-résistante à de nombreux antibiotiques est préoccupante. Il est urgent de renforcer notre arsenal thérapeutique. L'étude de processus essentiels à la propagation des bactéries, comme la division cellulaire apparaît être une bonne solution pour trouver de nouvelles cibles moléculaires. Il existe deux voies pour trouver des inhibiteurs de la division bactérienne. La première, principalement «industrielle», consisterait à trouver des inhibiteurs de la division lors d'un criblage à haut débit de chimiothèque. La deuxième, principalement «académique» consiste à étudier les mécanismes moléculaires responsables de la division bactérienne. Cette étude peut aller jusqu'à la résolution de structure tridimensionnelle et permettre de concevoir des molécules spécifiques interférant avec la fonction des protéines ciblées. Mon travail s'inscrit dans la deuxième voie. Il pose les bases d'un travail à plus long terme. La division chez *S. pneumoniae* est très peu étudiée. Par homologie avec les protéines des bactéries *E. coli* et *B. subtilis*, les protéines DivIB, DivIC et FtsL ont été identifiées. Ces protéines sont connues pour être centrales dans le processus de recrutement des protéines de la division au septum. Elles nécessitent la localisation de protéines cytoplasmiques importantes pour l'invagination de la membrane et la ségrégation des chromosomes. Et elles sont nécessaires à la localisation de protéines membranaires principalement impliquées dans la synthèse du PG septal.

Dans le but de caractériser la fonction de ces trois protéines chez *S. pneumoniae*, nous avons décidé de les étudier d'un point de vue moléculaire et cellulaire. Nous avons exploité des outils (BIAcore® et Triple hybride) permettant une manipulation moléculaire du complexe ternaire DivIB, DivIC et FtsL. L'utilisation de ces outils nous a permis d'une part de calculer la constante d'affinité apparente du complexe ternaire reconstitué *in vitro*, qui est de 300 nM. D'autre part, le test triple hybride a montré l'existence de ce complexe ternaire avec les protéines membranaires entières de *S. pneumoniae*. La combinaison de ces deux approches *in vitro* et *ex vivo* établit de manière forte l'existence de ce complexe ternaire chez le pneumocoque. La maîtrise de ces tests permettra de dresser la carte des épitopes d'interaction et éventuellement de détecter des interactions avec d'autres partenaires potentiels. Ce travail est en train d'être accompli au laboratoire par Soizic Masson, qui en parallèle tente d'obtenir la structure tridimensionnelle du complexe ternaire.

Par ailleurs, nous avons entrepris de caractériser d'un point de vue cellulaire ces protéines chez le pathogène *S. pneumoniae*. Pour cela, la quantification *in vivo* de DivIB,

DivIC et FtsL, qui est respectivement de  $200 \pm 40$ ,  $1800 \pm 200$ , et  $150 \pm 60$  molécules/cellule a été réalisée. Ces données suggèrent que contrairement à *B. subtilis*, DivIB n'est pas très abondant, pas plus que la majorité des protéines impliquées dans la division. Chez *B. subtilis*, il a été montré que seul 2% des molécules suffisent à maintenir le processus de division végétative. Il semblerait alors que l'excès de ces molécules ne sert pas à fabriquer une paroi plus épaisse chez les bactéries à Gram positif, comme ceci avait pu être suggéré, mais peut être que cet excès est nécessaire aux étapes de sporulation chez *B. subtilis*. Tout comme DivIB, FtsL est peu abondante et présente en quantité comparable aux autres protéines de la division. Enfin, DivIC est dix fois plus abondante, présente à environ 2000 molécules/cellule. Elle n'est donc pas la protéine limitante pour la formation du complexe ternaire.

Afin d'étudier le rôle de ces trois protéines dans la division du pneumocoque, la délétion de ces trois gènes a été tentée. Les gènes de *ftsL* et *divIC* sont essentiels à la survie du pneumocoque, tout comme leur homologue chez *B. subtilis* et *E. coli*. Par conséquent, ces deux protéines constituent des cibles potentielles pour de nouvelles antibiothérapies.

En ce qui concerne le gène *divIB* ou son orthologue *ftsQ*, il existe des divergences quant à son essentialité entre *B. subtilis* et *E. coli*. Il était donc intéressant de connaître ce qu'il en était chez le pneumocoque, bactérie à Gram positif. Le gène *divIB* de *S. pneumoniae*, comme chez *B. subtilis*, n'est pas essentiel pour la survie du pneumocoque en milieu riche. Cependant, l'analyse morphologique par différentes techniques de microscopie a révélé des défauts de septation dans certaines cellules (<5%) et des défauts de séparation des cellules filles. Chez *S. pneumoniae*, DivIB est donc impliquée dans la division bactérienne mais n'est pas essentielle à la survie de la bactérie dans des conditions de laboratoire optimale pour sa croissance. En revanche, nous avons observé que DivIB est essentielle pour la croissance du pneumocoque en milieu défini. L'ajout de sels, d'agents osmolarisant, d'acides aminés manquant dans la composition du milieu défini ne restore pas la croissance du mutant de délétion. En revanche, l'ajout d'une copie du gène *ftsL*, et non de *divIC*, sous le contrôle d'un promoteur inductible restore la croissance du mutant nul pour *divIB* en milieu défini. Par ailleurs, nous avons démontré que DivIB stabilise FtsL *in vivo* alors que la stabilité d'autres protéines de la division reste inchangée jusqu'à 150 minutes après arrêt de la synthèse protéique. La diminution de la quantité de FtsL en absence de DivIB ne peut être observée qu'en absence de néo-synthèse protéique. Par conséquent, il semble que lorsque la synthèse protéique peut avoir lieu, la quantité de FtsL est maintenue par une synthèse plus importante compensant sa dégradation. Il est possible qu'en milieu défini, la bactérie ne synthétise pas assez de FtsL à partir de l'unique copie du gène *ftsL*. L'ajout d'une copie supplémentaire

ectopique du gène *ftsL* peut pallier à ce manque et restaurer la croissance bactérienne en absence de DivIB. Chez *B. subtilis*, DivIB est essentielle à haute température là où FtsL est instable. En conclusion, nous suggérons que le phénotype d'essentialité de DivIB est relié à la stabilité de FtsL.

Les récentes structures de la partie extracellulaire de DivIB ont montré l'existence de trois domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . L'analyse fonctionnelle par complémentation avec des constructions de DivIB plus ou moins tronquées, a permis de montrer la contribution des différents domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans la fonction de DivIB de *S. pneumoniae*. La séquence du domaine C-terminal  $\gamma$  est connue pour être non conservée, de taille variable voir même absente chez certaines espèces, comme chez *Haemophilus influenza* et *Legionella pneumophila*. Le domaine  $\gamma$  de FtsQ d'*E. coli* est non structuré (254). Chez *S. pneumoniae*, le domaine  $\gamma$  n'est pas important pour l'interaction avec FtsL et DivIC (190). Nous avons démontré que l'expression de DivIB $\Delta\gamma$  restaure la croissance du mutant  $\Delta divIB$  en milieu défini et la formation de cellule de morphologie normale, majoritairement en dicoque. Par conséquent, le domaine  $\gamma$  est non essentiel pour la fonction de DivIB chez le pneumocoque. En revanche, la région conservée du domaine extracellulaire de DivIB, comprenant les 212 résidus suivant le segment transmembranaire, est nécessaire à la fonction de DivIB. La complémentation avec une protéine tronquée sans domaine extracellulaire, *divIB* $\Delta extra$ , ne modifie pas le phénotype du mutant de délétion. Cependant, l'expression de DivIB $\Delta extra$  n'a pas pu être vérifiée. La région conservée est organisée en deux domaines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (253). Nous avons montré que la complémentation avec *divIB* $\Delta\beta\gamma$ , laissant intact le domaine  $\alpha$  de DivIB, ne restaure pas le phénotype sauvage du pneumocoque. Le domaine  $\beta$  est donc nécessaire à la fonction de DivIB. Fait intéressant, la complémentation avec un domaine  $\beta$  tronqué dans sa partie C-terminale (S337\*) ne restaure pas la croissance en milieu défini du mutant  $\Delta divIB$  mais rétablit la morphologie normale, majoritairement en dicoque, du pneumocoque en milieu riche. Ces deux défauts peuvent donc être séparés. D'ailleurs, inversement, nous avons constaté que l'addition d'une copie de gène *ftsL* restaure la croissance du mutant  $\Delta divIB$  en milieu défini mais n'empêche pas la formation des chaînettes. Chez *E. coli*, le mutant *ftsQ2*, exprimant une protéine FtsQ tronquée de façon similaire dans sa partie C-terminale à *divIB*S337\* de *S. pneumoniae*, est incapable de recruter FtsL au site de division (40). D'autres mutations indiquent que les acides aminés 250 à 256, et l'acide aminé D237 sont importants pour le recrutement de FtsL et DivIC au site de division d'*E. coli* (93, 254). Ces observations suggèrent que la partie C-terminale du domaine  $\beta$  est importante pour l'interaction avec FtsL.

L'expression de DivIBS337\* ne restaurant pas la croissance du mutant  $\Delta divIB$ , il est raisonnable d'avancer que l'essentialité de DivIB résulte d'une relation fonctionnelle avec FtsL.

Le domaine  $\alpha$ , correspondant au domaine POTRA décrit par Sanchez-Pulido (219), reste un domaine sensible à la trypsine dans la forme soluble recombinante de la partie extracellulaire de DivIB du pneumocoque, comme pour DivIB de *G. stearothermophilus*. Pourtant, récemment, la structure cristallographique de la partie périplasmique de FtsQ d'*E. coli* et de *Yersinia enterocolitica* a été résolue et montre un domaine  $\alpha$  structuré. Pourquoi, malgré des constructions similaires, les domaines  $\alpha$  de ces protéines se comportent différemment ? S'agit-il d'une réelle différence de structure des bactéries à Gram positif et Gram négatif en ce qui concerne ce domaine POTRA ? En effet, ce domaine est présent dans des protéines impliquées dans le transport de polypeptides notamment vers la membrane externe, membrane absente chez les bactéries à Gram positif. Ou bien existe-t-il un équilibre fragile entre une forme repliée et non repliée de ce domaine ?

Le résidu le plus conservé de DivIB/FtsQ est un glutamate en position 222 chez *S. pneumoniae*. Chez *B. subtilis*, la mutation de ce glutamate 122 en alanine n'empêche pas la localisation septale (258). Chez *E. coli*, une mutation du glutamate 125 en lysine déstabilise FtsQ (1, 30), probablement pour des raisons structurales (254). Ces résultats peuvent être expliqués de la façon suivante. Le glutamate 125 conservé fait partie d'un feuillet  $\beta$ . Or, les brins beta interagissent par leurs chaînes principales et non à l'aide des chaînes latérales des résidus. Cependant, sur la structure de FtsQ d'*E. coli*, on constate que les brins  $\beta$  s'écarterent au niveau du glutamate 125 conservé. La chaîne latérale du glutamate interagit avec la chaîne principale voisine pour maintenir le feuillet  $\beta$ . Un changement en alanine peut favoriser la formation du feuillet  $\beta$ . En revanche, un changement en lysine provoque une gêne stérique incompatible avec la présence du feuillet  $\beta$ . Chez le pneumocoque, l'expression de DivIBE222A permet de restaurer la majorité du phénotype sauvage. Cependant, les défauts de séparation des cellules demeurent. Le glutamate étant un résidu très conservé, le changement en alanine ne déstructure probablement pas DivIB mais a sûrement un impact sur sa fonction, pourquoi pas à un stade tardif de la division, pour la séparation des cellules.

On a vu que le mutant  $\Delta divIB$  forme des chainettes de dicoques qui sont reliés par l'extrémité des cellules, comme les mutants *lytA* et *lytB*. LytA et LytB sont des hydrolases du PG, impliquées dans la séparation des cellules filles lors de la division (62). La formation des chainettes en absence de DivIB pourrait être due à une modification de la composition du PG.



Or, il n'y pas d'importantes modifications de la quantité des différents muropeptides dans la paroi du mutant  $\Delta divIB$  (W. Vollmer, communication personnelle). Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse selon laquelle la composition locale du PG soit changée. Il pourrait être intéressant de regarder la localisation de ces différentes hydrolases en absence de DivIB. LytA et LytB sont des « choline binding proteins » qui se lient comme leur nom l'indique aux cholines des acides teichoïques de la paroi. LytA se localise au site de division et semble impliqué dans la lyse des cellules en phase stationnaire. LytB se localise au futur pôle des cellules filles et est responsable de la séparation des deux cellules filles. En revanche, il n'est pas connu pourquoi ces enzymes ont des localisations différentes bien que toutes deux reconnaissent la choline. D'autres facteurs doivent influencer leur localisation, pourquoi pas DivIB ?

L'augmentation de la sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines en absence de DivIB, soutient l'hypothèse que DivIB puisse être impliquée directement ou non dans la synthèse du PG. Aucun effet n'a pu être mesuré avec des antibiotiques ciblant l'ADN ou la synthèse des protéines. Dans une souche résistante aux  $\beta$ -lactamines, dans laquelle PBP2x a une affinité diminuée pour ces antibiotiques, l'absence de DivIB restaure la sensibilité au céfotaxime et à la pénicilline G. Par conséquent, DivIB semble être une cible de choix pour rétablir l'efficacité des antibactériens les plus testés et les plus utilisés au monde, les  $\beta$ -lactamines.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aarsman, M. E., A. Piette, C. Fraipont, T. M. Vinkenvleugel, M. Nguyen-Disteche, and T. den Blaauwen.** 2005. Maturation of the *Escherichia Coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol* **55**:1631-45.
2. **Addinall, S. G., E. Bi, and J. Lutkenhaus.** 1996. FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J Bacteriol* **178**:3877-84.
3. **Addinall, S. G., C. Cao, and J. Lutkenhaus.** 1997. FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **25**:303-9.
4. **Addinall, S. G., and J. Lutkenhaus.** 1996. FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol* **178**:7167-72.
5. **Aldea, M., C. Hernandez-Chico, A. G. de la Campa, S. R. Kushner, and M. Vicente.** 1988. Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **170**:5169-76.
6. **Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak, and D. Sherratt.** 2002. FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**:195-205.
7. **Barak, I., and A. J. Wilkinson.** 2007. Division site recognition in *Escherichia Coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **31**:311-26.
8. **Beall, B., and J. Lutkenhaus.** 1992. Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J Bacteriol* **174**:2398-403.
9. **Beall, B., and J. Lutkenhaus.** 1989. Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. *J Bacteriol* **171**:6821-34.
10. **Begg, K. J., S. J. Dewar, and W. D. Donachie.** 1995. A new *Escherichia Coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* **177**:6211-22.
11. **Begg, K. J., and W. D. Donachie.** 1985. Cell shape and division in *Escherichia Coli*: experiments with shape and division mutants. *J Bacteriol* **163**:615-22.
12. **Begg, K. J., G. F. Hatfull, and W. D. Donachie.** 1980. Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia Coli*: cell division gene *ftsQ*. *J Bacteriol* **144**:435-7.
13. **Begg, K. J., A. Takasuga, D. H. Edwards, S. J. Dewar, B. G. Spratt, H. Adachi, T. Ohta, H. Matsuzawa, and W. D. Donachie.** 1990. The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia Coli* cells will elongate or divide. *J Bacteriol* **172**:6697-703.
14. **Bennett, J. A., R. M. Aimino, and J. R. McCormick.** 2007. *Streptomyces coelicolor* genes *ftsL* and *divIC* play a role in cell division, but are dispensable for colony formation. *J Bacteriol*.
15. **Bennett, J. A., and J. R. McCormick.** 2001. Two new loci affecting cell division identified as suppressors of an *ftsQ*-null mutation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* **202**:251-6.
16. **Bernhardt, T. G., and P. A. de Boer.** 2003. The *Escherichia Coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**:1171-82.
17. **Bernhardt, T. G., and P. A. de Boer.** 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* **18**:555-64.
18. **Bi, E. F., and J. Lutkenhaus.** 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia Coli*. *Nature* **354**:161-4.
19. **Bigot, S., J. Corre, J. M. Louarn, F. Cornet, and F. X. Barre.** 2004. FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* **54**:876-86.
20. **Bork, P., C. Sander, and A. Valencia.** 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7290-4.
21. **Botta, G. A., and J. T. Park.** 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol* **145**:333-40.
22. **Boyle, D. S., M. M. Khattar, S. G. Addinall, J. Lutkenhaus, and W. D. Donachie.** 1997. *ftsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **24**:1263-73.
23. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
24. **Bramhill, D.** 1997. Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:395-424.
25. **Bramhill, D., and C. M. Thompson.** 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia Coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5813-7.

26. **Bramkamp, M., L. Weston, R. A. Daniel, and J. Errington.** 2006. Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **62**:580-91.
27. **Breakefield, X. O., and O. E. Landman.** 1973. Temperature-sensitive divisionless mutant of *Bacillus subtilis* defective in the initiation of septation. *J Bacteriol* **113**:985-98.
28. **Briles, E. B., and A. Tomasz.** 1970. Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram positive bacterium: segregation of choline 3H labelled teichoic acid. *Journal of Cell Biology* **47**:786-90.
29. **Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson, and J. L. Goldstein.** 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**:391-8.
30. **Buddelmeijer, N., M. E. Aarsman, A. H. Kolk, M. Vicente, and N. Nanninga.** 1998. Localization of cell division protein FtsQ by immunofluorescence microscopy in dividing and nondividing cells of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **180**:6107-16.
31. **Buddelmeijer, N., and J. Beckwith.** 2002. Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center. *Curr Opin Microbiol* **5**:553-7.
32. **Buddelmeijer, N., and J. Beckwith.** 2004. A complex of the *Escherichia Coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* **52**:1315-27.
33. **Buddelmeijer, N., N. Judson, D. Boyd, J. J. Mekalanos, and J. Beckwith.** 2002. YgbQ, a cell division protein in *Escherichia Coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6316-21.
34. **Burdett, I. D., and R. G. Murray.** 1974. Septum formation in *Escherichia Coli*: characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division. *J Bacteriol* **119**:303-24.
35. **Cabeen, M. T., and C. Jacobs-Wagner.** 2005. Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **3**:601-10.
36. **Callister, H., and R. G. Wake.** 1981. Characterization and mapping of temperature-sensitive division initiation mutations of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **145**:1042-51.
37. **Carettoni, D., P. Gomez-Puertas, L. Yim, J. Mingorance, O. Massidda, M. Vicente, A. Valencia, E. Domenici, and D. Anderluzzi.** 2003. Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of *Escherichia Coli* FtsA. *Proteins* **50**:192-206.
38. **Carson, M. J., J. Barondess, and J. Beckwith.** 1991. The FtsQ protein of *Escherichia Coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol* **173**:2187-95.
39. **Chen, J. C., and J. Beckwith.** 2001. FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia Coli* cell division. *Mol Microbiol* **42**:395-413.
40. **Chen, J. C., M. Minev, and J. Beckwith.** 2002. Analysis of *ftsQ* mutant alleles in *Escherichia Coli*: complementation, septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *J Bacteriol* **184**:695-705.
41. **Chen, J. C., D. S. Weiss, J. M. Ghigo, and J. Beckwith.** 1999. Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **181**:521-30.
42. **Copeland, J. C., and J. Marmur.** 1968. Identification of conserved genetic functions in *Bacillus* by use of temperature-sensitive mutants. *Bacteriol Rev* **32**:302-12.
43. **Corbin, B. D., B. Geissler, M. Sadasivam, and W. Margolin.** 2004. Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J Bacteriol* **186**:7736-44.
44. **Corbin, B. D., Y. Wang, T. K. Beuria, and W. Margolin.** 2007. Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *J Bacteriol* **189**:3026-35.
45. **Cordell, S. C., E. J. Robinson, and J. Lowe.** 2003. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7889-94.
46. **D'Ulisse, V., M. Fagioli, P. Ghelardini, and L. Paolozzi.** 2007. Three functional subdomains of the *Escherichia Coli* FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins. *Microbiology* **153**:124-138.
47. **Dai, K., and J. Lutkenhaus.** 1992. The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **174**:6145-51.
48. **Dai, K., Y. Xu, and J. Lutkenhaus.** 1993. Cloning and characterization of *ftsN*, an essential cell division gene in *Escherichia Coli* isolated as a multicopy suppressor of *ftsA12*(Ts). *J Bacteriol* **175**:3790-7.
49. **Dai, K., Y. Xu, and J. Lutkenhaus.** 1996. Topological characterization of the essential *Escherichia Coli* cell division protein FtsN. *J Bacteriol* **178**:1328-34.
50. **Daniel, R. A., and J. Errington.** 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**:767-76.

51. **Daniel, R. A., and J. Errington.** 2000. Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol* **36**:278-89.
52. **Daniel, R. A., E. J. Harry, and J. Errington.** 2000. Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**:299-311.
53. **Daniel, R. A., E. J. Harry, V. L. Katis, R. G. Wake, and J. Errington.** 1998. Characterization of the essential cell division gene *ftsL*(yIID) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* **29**:593-604.
54. **Daniel, R. A., M. F. Noirot-Gros, P. Noirot, and J. Errington.** 2006. Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. *J Bacteriol* **188**:7396-404.
55. **Daniel, R. A., A. M. Williams, and J. Errington.** 1996. A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:2343-50.
56. **Datta, P., A. Dasgupta, S. Bhakta, and J. Basu.** 2002. Interaction between FtsZ and FtsW of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **277**:24983-7.
57. **Datta, P., A. Dasgupta, A. K. Singh, P. Mukherjee, M. Kundu, and J. Basu.** 2006. Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. *Mol Microbiol* **62**:1655-73.
58. **de Boer, P., R. Crossley, and L. Rothfield.** 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**:254-6.
59. **de Boer, P. A., R. E. Crossley, A. R. Hand, and L. I. Rothfield.** 1991. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia Coli* division site. *Embo J* **10**:4371-80.
60. **de Boer, P. A., R. E. Crossley, and L. I. Rothfield.** 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **174**:63-70.
61. **De Crescenzo, G., J. R. Litowski, R. S. Hodges, and M. D. O'Connor-McCourt.** 2003. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry* **42**:1754-63.
62. **De Las Rivas, B., J. L. Garcia, R. Lopez, and P. Garcia.** 2002. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* **184**:4988-5000.
63. **de Leeuw, E., B. Graham, G. J. Phillips, C. M. ten Hagen-Jongman, B. Oudega, and J. Luijck.** 1999. Molecular characterization of *Escherichia Coli* FtsE and FtsX. *Mol Microbiol* **31**:983-93.
64. **de Pedro, M. A., W. D. Donachie, J. V. Holtje, and H. Schwarz.** 2001. Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia Coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *J Bacteriol* **183**:4115-26.
65. **Den Blaauwen, T., N. Buddelmeijer, M. E. Aarsman, C. M. Hameete, and N. Nanninga.** 1999. Timing of FtsZ assembly in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **181**:5167-75.
66. **den Blaauwen, T., M. A. de Pedro, M. Nguyen-Disteche, and J. A. Ayala.** 2008. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev* **32**:321-44.
67. **Denome, S. A., P. K. Elf, T. A. Henderson, D. E. Nelson, and K. D. Young.** 1999. *Escherichia Coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* **181**:3981-93.
68. **Derouaux, A., B. Wolf, C. Fraipont, E. Breukink, M. Nguyen-Disteche, and M. Terrak.** 2008. The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia Coli* localizes to the cell division site and interacts with penicillin-binding protein 3, FtsW, and FtsN. *J Bacteriol* **190**:1831-4.
69. **Di Lallo, G., L. Castagnoli, P. Ghelardini, and L. Paolozzi.** 2001. A two-hybrid system based on chimeric operator recognition for studying protein homo/heterodimerization in *Escherichia Coli*. *Microbiology* **147**:1651-6.
70. **Di Lallo, G., M. Fagioli, D. Barionovi, P. Ghelardini, and L. Paolozzi.** 2003. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology* **149**:3353-9.
71. **Dopazo, A., P. Palacios, M. Sanchez, J. Pla, and M. Vicente.** 1992. An amino-proximal domain required for the localization of FtsQ in the cytoplasmic membrane, and for its biological function in *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **6**:715-22.
72. **Dougherty, T. J., K. Kennedy, R. E. Kessler, and M. J. Pucci.** 1996. Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **178**:6110-5.
73. **Draper, G. C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters, and W. D. Donachie.** 1998. Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* **180**:4621-7.

74. **England, J. C., and J. W. Gober.** 2001. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **4**:674-80.
75. **Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor, and D. Bramhill.** 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:519-23.
76. **Errington, J., R. A. Daniel, and D. J. Scheffers.** 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:52-65.
77. **Fadda, D., C. Pischedda, F. Caldara, M. B. Whalen, D. Anderluzzi, E. Domenici, and O. Massidda.** 2003. Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**:6209-14.
78. **Fernandes, P.** 2006. Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat Biotechnol* **24**:1497-503.
79. **Feucht, A., R. A. Daniel, and J. Errington.** 1999. Characterization of a morphological checkpoint coupling cell-specific transcription to septation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **33**:1015-26.
80. **Feucht, A., I. Lucet, M. D. Yudkin, and J. Errington.** 2001. Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **40**:115-25.
81. **Fleming, A.** 1929. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* *British Journal of Experimental pathology* **10**:226-236.
82. **Flynn, J. M., S. B. Neher, Y. I. Kim, R. T. Sauer, and T. A. Baker.** 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**:671-83.
83. **Garcia, P., M. P. Gonzalez, E. Garcia, R. Lopez, and J. L. Garcia.** 1999. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* **31**:1275-81.
84. **Geissler, B., D. Elraheb, and W. Margolin.** 2003. A gain-of-function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4197-202.
85. **Geissler, B., and W. Margolin.** 2005. Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol* **58**:596-612.
86. **Gerard, P., T. Vernet, and A. Zapun.** 2002. Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol* **184**:1925-31.
87. **Ghigo, J. M., and J. Beckwith.** 2000. Cell division in *Escherichia Coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J Bacteriol* **182**:116-29.
88. **Ghigo, J. M., D. S. Weiss, J. C. Chen, J. C. Yarrow, and J. Beckwith.** 1999. Localization of FtsL to the *Escherichia Coli* septal ring. *Mol Microbiol* **31**:725-37.
89. **Gill, D. R., G. F. Hatfull, and G. P. Salmond.** 1986. A new cell division operon in *Escherichia Coli*. *Mol Gen Genet* **205**:134-45.
90. **Goehring, N. W., and J. Beckwith.** 2005. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* **15**:R514-26.
91. **Goehring, N. W., M. D. Gonzalez, and J. Beckwith.** 2006. Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol Microbiol* **61**:33-45.
92. **Goehring, N. W., F. Gueiros-Filho, and J. Beckwith.** 2005. Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia Coli*. *Genes Dev* **19**:127-37.
93. **Goehring, N. W., I. Petrovska, D. Boyd, and J. Beckwith.** 2007. Mutants, Suppressors, and Wrinkled Colonies: Mutant Alleles of the Cell Division Gene *ftsQ* Point to Functional Domains in FtsQ and a Role for Domain 1C of FtsA in Divisome Assembly. *J Bacteriol* **189**:633-45.
94. **Goehring, N. W., C. Robichon, and J. Beckwith.** 2007. Role for the nonessential N terminus of FtsN in divisome assembly. *J Bacteriol* **189**:646-9.
95. **Goffin, C., C. Fraipont, J. Ayala, M. Terrak, M. Nguyen-Disteche, and J. M. Ghuysen.** 1996. The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of *Escherichia Coli* is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *J Bacteriol* **178**:5402-9.
96. **Goffin, C., and J. M. Ghuysen.** 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1079-93.
97. **Goranov, A. I., L. Katz, A. M. Breier, C. B. Burge, and A. D. Grossman.** 2005. A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:12932-7.
98. **Gottesman, S., and M. R. Maurizi.** 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**:592-621.

99. **Grunenfelder, B., G. Rummel, J. Vohradsky, D. Roder, H. Langen, and U. Jenal.** 2001. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4681-6.
100. **Gueiros-Filho, F. J., and R. Losick.** 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* **16**:2544-56.
101. **Guzman, L. M., J. J. Barondess, and J. Beckwith.** 1992. FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **174**:7716-28.
102. **Guzman, L. M., D. S. Weiss, and J. Beckwith.** 1997. Domain-swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane proteins essential for cell division in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **179**:5094-103.
103. **Haeusser, D. P., R. L. Schwartz, A. M. Smith, M. E. Oates, and P. A. Levin.** 2004. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol* **52**:801-14.
104. **Hale, C. A., and P. A. de Boer.** 1997. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**:175-85.
105. **Hale, C. A., and P. A. de Boer.** 1999. Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia Coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol* **181**:167-76.
106. **Hale, C. A., and P. A. de Boer.** 2002. ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **184**:2552-6.
107. **Hale, C. A., A. C. Rhee, and P. A. de Boer.** 2000. ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol* **182**:5153-66.
108. **Hamoen, L. W., and J. Errington.** 2003. Polar targeting of DivIVA in *Bacillus subtilis* is not directly dependent on FtsZ or PBP 2B. *J Bacteriol* **185**:693-7.
109. **Hamoen, L. W., J. C. Meile, W. de Jong, P. Noirot, and J. Errington.** 2006. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol* **59**:989-99.
110. **Hardie, J. M., and R. A. Whiley.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **26**:1S-11S.
111. **Harry, E., L. Monahan, and L. Thompson.** 2006. Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol* **253**:27-94.
112. **Harry, E. J.** 2001. Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol* **40**:795-803.
113. **Harry, E. J., S. R. Partridge, A. S. Weiss, and R. G. Wake.** 1994. Conservation of the 168 *divIB* gene in *Bacillus subtilis* W23 and *B. licheniformis*, and evidence for homology to *ftsQ* of *Escherichia Coli*. *Gene* **147**:85-9.
114. **Harry, E. J., B. J. Stewart, and R. G. Wake.** 1993. Characterization of mutations in *divIB* of *Bacillus subtilis* and cellular localization of the DivIB protein. *Mol Microbiol* **7**:611-21.
115. **Harry, E. J., and R. G. Wake.** 1989. Cloning and expression of a *Bacillus subtilis* division initiation gene for which a homolog has not been identified in another organism. *J Bacteriol* **171**:6835-9.
116. **Harry, E. J., and R. G. Wake.** 1997. The membrane-bound cell division protein DivIB is localized to the division site in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **25**:275-83.
117. **Heidrich, C., M. F. Templin, A. Ursinus, M. Merdanovic, J. Berger, H. Schwarz, M. A. de Pedro, and J. V. Holtje.** 2001. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **41**:167-78.
118. **Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz, and J. V. Holtje.** 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **184**:6093-9.
119. **Henriques, A. O., H. de Lencastre, and P. J. Piggot.** 1992. A *Bacillus subtilis* morphogene cluster that includes *spoVE* is homologous to the *mra* region of *Escherichia Coli*. *Biochimie* **74**:735-48.
120. **Henriques, A. O., P. Glaser, P. J. Piggot, and C. P. Moran, Jr.** 1998. Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**:235-47.
121. **Higgins, M. L., and G. D. Shockman.** 1970. Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **101**:643-8.
122. **Higgins, M. L., and G. D. Shockman.** 1976. Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. *J Bacteriol* **127**:1346-58.
123. **Hirota, Y., A. Ryter, and F. Jacob.** 1968. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33**:677-93.
124. **Holtje, J. V.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia Coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:181-203.
125. **Honeyman, A. L., and G. C. Stewart.** 1989. The nucleotide sequence of the *rodC* operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **3**:1257-68.
126. **Hu, J. C.** 2001. Model systems: Studying molecular recognition using bacterial n-hybrid systems. *Trends Microbiol* **9**:219-22.

127. **Hu, J. C., M. G. Kornacker, and A. Hochschild.** 2000. *Escherichia Coli* one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions. *Methods* **20**:80-94.
128. **Hu, J. C., E. K. O'Shea, P. S. Kim, and R. T. Sauer.** 1990. Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* **250**:1400-3.
129. **Hu, Z., and J. Lutkenhaus.** 2000. Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *J Bacteriol* **182**:3965-71.
130. **Hu, Z., A. Mukherjee, S. Pichoff, and J. Lutkenhaus.** 1999. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia Coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14819-24.
131. **Iida, K., S. Hirata, S. Nakamuta, and M. Koike.** 1978. Inhibition of cell division of *Escherichia Coli* by a new synthetic penicillin, piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* **14**:257-66.
132. **Ikeda, M., T. Sato, M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino, Y. Kobayashi, and M. Matsuhashi.** 1989. Structural similarity among *Escherichia Coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. *J Bacteriol* **171**:6375-8.
133. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia Coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-8.
134. **Ip, S. C., M. Bregu, F. X. Barre, and D. J. Sherratt.** 2003. Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *Embo J* **22**:6399-407.
135. **Ishikawa, S., Y. Kawai, K. Hiramatsu, M. Kuwano, and N. Ogasawara.** 2006. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **60**:1364-80.
136. **Ishino, F., H. K. Jung, M. Ikeda, M. Doi, M. Wachi, and M. Matsuhashi.** 1989. New mutations *fts-36*, *fts-33*, and *ftsW* clustered in the *mra* region of the *Escherichia Coli* chromosome induce thermosensitive cell growth and division. *J Bacteriol* **171**:5523-30.
137. **Jacobs, M. R., H. J. Koornhof, R. M. Robins-Browne, C. M. Stevenson, Z. A. Vermaak, I. Freiman, G. B. Miller, M. A. Witcomb, M. Isaacson, J. I. Ward, and R. Austrian.** 1978. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* **299**:735-40.
138. **Jensen, S. O., L. S. Thompson, and E. J. Harry.** 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol* **187**:6536-44.
139. **Karimova, G., N. Dautin, and D. Ladant.** 2005. Interaction network among *Escherichia Coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**:2233-43.
140. **Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant.** 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5752-6.
141. **Katis, V. L., E. J. Harry, and R. G. Wake.** 1997. The *Bacillus subtilis* division protein DivIC is a highly abundant membrane-bound protein that localizes to the division site. *Mol Microbiol* **26**:1047-55.
142. **Katis, V. L., and R. G. Wake.** 1999. Membrane-bound division proteins DivIB and DivIC of *Bacillus subtilis* function solely through their external domains in both vegetative and sporulation division. *J Bacteriol* **181**:2710-8.
143. **Katis, V. L., R. G. Wake, and E. J. Harry.** 2000. Septal localization of the membrane-bound division proteins of *Bacillus subtilis* DivIB and DivIC is codependent only at high temperatures and requires FtsZ. *J Bacteriol* **182**:3607-11.
144. **Kawai, Y., and N. Ogasawara.** 2006. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology* **152**:1129-41.
145. **Ladant, D., and G. Karimova.** 2000. Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria. *Res Microbiol* **151**:711-20.
146. **Lara, B., and J. A. Ayala.** 2002. Topological characterization of the essential *Escherichia Coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett* **216**:23-32.
147. **Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance, and O. Massidda.** 2005. Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol Microbiol* **55**:699-711.
148. **Levin, P. A., I. G. Kurtser, and A. D. Grossman.** 1999. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9642-7.
149. **Levin, P. A., and R. Losick.** 1994. Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J Bacteriol* **176**:1451-9.
150. **Levin, P. A., and R. Losick.** 1996. Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10**:478-88.



151. Levine, O. S., K. L. O'Brien, M. Knoll, R. A. Adegbola, S. Black, T. Cherian, R. Dagan, D. Goldblatt, A. Grange, B. Greenwood, T. Hennessy, K. P. Klugman, S. A. Madhi, K. Mulholland, H. Nohynek, M. Santosham, S. K. Saha, J. A. Scott, S. Sow, C. G. Whitney, and F. Cutts. 2006. Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet* **367**:1880-2.
152. Li, Z., M. J. Trimble, Y. V. Brun, and G. J. Jensen. 2007. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *Embo J* **26**:4694-708.
153. Liu, G., G. C. Draper, and W. D. Donachie. 1998. FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **29**:893-903.
154. Liu, Z., A. Mukherjee, and J. Lutkenhaus. 1999. Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol Microbiol* **31**:1853-61.
155. Lleo, M. M., P. Canepari, and G. Satta. 1990. Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *J Bacteriol* **172**:3758-71.
156. Lock, R. L., and E. J. Harry. 2008. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*.
157. Longo, F., M. A. Marchetti, L. Castagnoli, P. A. Battaglia, and F. Gigliani. 1995. A novel approach to protein-protein interaction: complex formation between the p53 tumor suppressor and the HIV Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **206**:326-34.
158. Low, H. H., M. C. Moncrieffe, and J. Lowe. 2004. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *J Mol Biol* **341**:839-52.
159. Lowe, J., and L. A. Amos. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**:203-6.
160. Lu, C., M. Reedy, and H. P. Erickson. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol* **182**:164-70.
161. Lu, C., J. Stricker, and H. P. Erickson. 1998. FtsZ from *Escherichia Coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**:71-86.
162. Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**:375-82.
163. Lutkenhaus, J. 2007. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* **76**:539-62.
164. Lutkenhaus, J. 1990. Regulation of cell division in *E. coli*. *Trends Genet* **6**:22-5.
165. Lutkenhaus, J., and S. G. Addinall. 1997. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem* **66**:93-116.
166. Lutkenhaus, J. F., and W. D. Donachie. 1979. Identification of the *ftsA* gene product. *J Bacteriol* **137**:1088-94.
167. Ma, X., D. W. Ehrhardt, and W. Margolin. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia Coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:12998-3003.
168. Ma, X., and W. Margolin. 1999. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia Coli* FtsZ. *J Bacteriol* **181**:7531-44.
169. Margolin, W. 2001. Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:647-52.
170. Margolin, W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev* **24**:531-48.
171. Markey, F. 1999. What is SPR anyway? *BIAjournal* **1**:14-17.
172. Massey, T. H., C. P. Mercogliano, J. Yates, D. J. Sherratt, and J. Lowe. 2006. Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* **23**:457-69.
173. Massidda, O., D. Anderluzzi, L. Friedli, and G. Feger. 1998. Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144** ( Pt 11):3069-78.
174. Matias, V. R., and T. J. Beveridge. 2005. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol Microbiol* **56**:240-51.
175. Matias, V. R., and T. J. Beveridge. 2006. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**:1011-21.
176. McCormick, J. R., and R. Losick. 1996. Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**:5295-301.
177. Mendelson, N. H., and R. M. Cole. 1972. Genetic regulation of cell division initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **112**:994-1003.
178. Mercer, K. L., and D. S. Weiss. 2002. The *Escherichia Coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol* **184**:904-12.

179. **Migocki, M. D., M. K. Freeman, R. G. Wake, and E. J. Harry.** 2002. The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* **3**:1163-7.
180. **Miyakawa, T., H. Matsuzawa, M. Matsuhashi, and Y. Sugino.** 1972. Cell wall peptidoglycan mutants of *Escherichia Coli* K-12: existence of two clusters of genes, *mra* and *mrh*, for cell wall peptidoglycan biosynthesis. *J Bacteriol* **112**:950-8.
181. **Mosyak, L., Y. Zhang, E. Glasfeld, S. Haney, M. Stahl, J. Seehra, and W. S. Somers.** 2000. The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *Embo J* **19**:3179-91.
182. **Mukherjee, A., K. Dai, and J. Lutkenhaus.** 1993. *Escherichia Coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1053-7.
183. **Mukherjee, A., and J. Lutkenhaus.** 1998. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *Embo J* **17**:462-9.
184. **Mukherjee, A., and J. Lutkenhaus.** 1994. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* **176**:2754-8.
185. **Muller, P., C. Ewers, U. Bertsche, M. Anstett, T. Kallis, E. Breukink, C. Fraipont, M. Terrak, M. Nguyen-Disteche, and W. Vollmer.** 2007. The essential cell division protein FtsN interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in *Escherichia Coli*. *J Biol Chem* **282**:36394-402.
186. **Murray, T., D. L. Popham, and P. Setlow.** 1997. Identification and characterization of *pbpA* encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 2A. *J Bacteriol* **179**:3021-9.
187. **Nanninga, N.** 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia Coli*. *Mol Microbiol* **5**:791-5.
188. **Nanninga, N.** 1998. Morphogenesis of *Escherichia Coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:110-29.
189. **Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, and M. E. Winkler.** 2004. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol Microbiol* **53**:1161-75.
190. **Noirclerc-Savoye, M., A. Le Gouellec, C. Morlot, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun.** 2005. In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **55**:413-24.
191. **Nukushina, J. I., and Y. Ikeda.** 1969. Genetic analysis of the developmental processes during germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores with temperature-sensitive mutants. *Genetics* **63**:63-74.
192. **Olijhoek, A. J., S. Klencke, E. Pas, N. Nanninga, and U. Schwarz.** 1982. Volume growth, murein synthesis, and murein cross-linkage during the division cycle of *Escherichia Coli* PA3092. *J Bacteriol* **152**:1248-54.
193. **Oliva, M. A., S. C. Cordell, and J. Lowe.** 2004. Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1243-50.
194. **Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck, and O. Dideberg.** 1996. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**:284-9.
195. **Pearl, L., B. O'Hara, R. Drew, and S. Wilson.** 1994. Crystal structure of AmiC: the controller of transcription antitermination in the amidase operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Embo J* **13**:5810-7.
196. **Peters, P. C., M. D. Migocki, C. Thoni, and E. J. Harry.** 2007. A new assembly pathway for the cytokinetic Z ring from a dynamic helical structure in vegetatively growing cells of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **64**:487-99.
197. **Pichoff, S., and J. Lutkenhaus.** 2005. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* **55**:1722-34.
198. **Pichoff, S., and J. Lutkenhaus.** 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia Coli*. *Embo J* **21**:685-93.
199. **Pinho, M. G., and J. Errington.** 2003. Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol Microbiol* **50**:871-81.
200. **Pla, J., M. Sanchez, P. Palacios, M. Vicente, and M. Aldea.** 1991. Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia Coli* septation. *Mol Microbiol* **5**:1681-6.
201. **Pogliano, J.** 2008. The bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **20**:19-27.
202. **Pogliano, J., K. Pogliano, D. S. Weiss, R. Losick, and J. Beckwith.** 1997. Inactivation of FtsI inhibits constriction of the FtsZ cytokinetic ring and delays the assembly of FtsZ rings at potential division sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:559-64.
203. **Popham, D. L., and P. Setlow.** 1996. Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants lacking multiple class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **178**:2079-85.
204. **Pucci, M. J., J. A. Thanassi, L. F. Discotto, R. E. Kessler, and T. J. Dougherty.** 1997. Identification and characterization of cell wall-cell division gene clusters in pathogenic gram-positive cocci. *J Bacteriol* **179**:5632-5.

205. **RayChaudhuri, D., and J. T. Park.** 1992. *Escherichia Coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**:251-4.
206. **Raymond, J., I. Le Thomas, F. Moulin, A. Commeau, D. Gendrel, and P. Berche.** 2000. Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. *J Infect Dis* **181**:1983-8.
207. **Real, G., S. Autret, E. J. Harry, J. Errington, and A. O. Henriques.** 2005. Cell division protein DivIB influences the Spo0J/Soj system of chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**:349-67.
208. **Real, G., A. Fay, A. Eldar, S. M. Pinto, A. O. Henriques, and J. Dworkin.** 2008. Determinants for the subcellular localization and function of a nonessential SEDS protein. *J Bacteriol* **190**:363-76.
209. **Reddy, M.** 2007. Role of FtsEX in cell division of *Escherichia Coli*: viability of *ftsEX* mutants is dependent on functional SufI or high osmotic strength. *J Bacteriol* **189**:98-108.
210. **Ricard, M., and Y. Hirota.** 1973. Process of cellular division in *Escherichia Coli*: physiological study on thermosensitive mutants defective in cell division. *J Bacteriol* **116**:314-22.
211. **Robertson, G. T., W. L. Ng, R. Gilmour, and M. E. Winkler.** 2003. Essentiality of *clpX*, but not *clpP*, *clpL*, *clpC*, or *clpE*, in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **185**:2961-6.
212. **Robson, S. A., and G. F. King.** 2006. Domain architecture and structure of the bacterial cell division protein DivIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6700-5.
213. **Robson, S. A., K. A. Michie, J. P. Mackay, E. Harry, and G. F. King.** 2002. The *Bacillus subtilis* cell division proteins FtsL and DivIC are intrinsically unstable and do not interact with one another in the absence of other septasomal components. *Mol Microbiol* **44**:663-74.
214. **Rothfield, L., S. Justice, and J. Garcia-Lara.** 1999. Bacterial cell division. *Annu Rev Genet* **33**:423-48.
215. **Rothfield, L., A. Taghbalout, and Y. L. Shih.** 2005. Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat Rev Microbiol* **3**:959-68.
216. **Rowland, S. L., V. L. Katis, S. R. Partridge, and R. G. Wake.** 1997. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **23**:295-302.
217. **Rueda, S., M. Vicente, and J. Mingorance.** 2003. Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia Coli* cell cycle. *J Bacteriol* **185**:3344-51.
218. **Sackett, M. J., A. J. Kelly, and Y. V. Brun.** 1998. Ordered expression of *ftsQA* and *ftsZ* during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *Mol Microbiol* **28**:421-34.
219. **Sanchez-Pulido, L., D. Devos, S. Genevrois, M. Vicente, and A. Valencia.** 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **28**:523-6.
220. **Scheffers, D. J., C. Robichon, G. J. Haan, T. den Blaauwen, G. Koningstein, E. van Bloois, J. Beckwith, and J. Luirink.** 2007. Contribution of the FtsQ transmembrane segment to localization to the cell division site. *J Bacteriol* **189**:7273-80.
221. **Schmidt, K. L., N. D. Peterson, R. J. Kustusch, M. C. Wissel, B. Graham, G. J. Phillips, and D. S. Weiss.** 2004. A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **186**:785-93.
222. **Schobel, S., S. Zellmeier, W. Schumann, and T. Wiegert.** 2004. The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol* **52**:1091-105.
223. **Scotti, P. A., M. L. Urbanus, J. Brunner, J. W. de Gier, G. von Heijne, C. van der Does, A. J. Driessen, B. Oudega, and J. Luirink.** 2000. YidC, the *Escherichia Coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *Embo J* **19**:542-9.
224. **Sharp, M. D., and K. Pogliano.** 2003. The membrane domain of SpoIIIE is required for membrane fusion during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* **185**:2005-8.
225. **Shih, Y. L., T. Le, and L. Rothfield.** 2003. Division site selection in *Escherichia Coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7865-70.
226. **Shiomi, D., and W. Margolin.** 2008. Compensation for the loss of the conserved membrane targeting sequence of FtsA provides new insights into its function. *Mol Microbiol* **67**:558-69.
227. **Shiomi, D., and W. Margolin.** 2007. Dimerization or oligomerization of the actin-like FtsA protein enhances the integrity of the cytokinetic Z ring. *Mol Microbiol* **66**:1396-415.
228. **Siddiqui, R. A., C. Hoischen, O. Holst, I. Heinze, B. Schlott, J. Gumpert, S. Diekmann, F. Grosse, and M. Platzer.** 2006. The analysis of cell division and cell wall synthesis genes reveals mutationally inactivated *ftsQ* and *mraY* in a protoplast-type L-form of *Escherichia Coli*. *FEMS Microbiol Lett* **258**:305-11.

229. Sievers, J., and J. Errington. 2000. Analysis of the essential cell division gene *ftsL* of *Bacillus subtilis* by mutagenesis and heterologous complementation. *J Bacteriol* **182**:5572-9.
230. Sievers, J., and J. Errington. 2000. The *Bacillus subtilis* cell division protein FtsL localizes to sites of septation and interacts with DivIC. *Mol Microbiol* **36**:846-55.
231. Song, J. H., K. S. Ko, J. Y. Lee, J. Y. Baek, W. S. Oh, H. S. Yoon, J. Y. Jeong, and J. Chun. 2005. Identification of Essential Genes in *Streptococcus pneumoniae* by Allelic Replacement Mutagenesis. *Mol Cells* **19**:365-374.
232. Spratt, B. G. 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia Coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:2999-3003.
233. Spratt, B. G. 1977. Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia Coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **131**:293-305.
234. Spratt, B. G., and K. D. Cromie. 1988. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* **10**:699-711.
235. Stahlberg, H., E. Kutejova, K. Muchova, M. Gregorini, A. Lustig, S. A. Muller, V. Olivieri, A. Engel, A. J. Wilkinson, and I. Barak. 2004. Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol Microbiol* **52**:1281-90.
236. Storts, D. R., and A. Markovitz. 1991. A novel rho promoter::Tn10 mutation suppresses and *ftsQ1*(Ts) missense mutation in an essential *Escherichia Coli* cell division gene by a mechanism not involving polarity suppression. *J Bacteriol* **173**:655-63.
237. Stricker, J., P. Maddox, E. D. Salmon, and H. P. Erickson. 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia Coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3171-5.
238. Takahashi, J., H. Komatsuzawa, S. Yamada, T. Nishida, H. Labischinski, T. Fujiwara, M. Ohara, J. Yamagishi, and M. Sugai. 2002. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* **46**:601-12.
239. Tamaki, S., H. Matsuzawa, and M. Matsuhashi. 1980. Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **141**:52-7.
240. Taschner, P. E., P. G. Huls, E. Pas, and C. L. Woldringh. 1988. Division behavior and shape changes in isogenic *ftsZ*, *ftsQ*, *ftsA*, *pbpB*, and *ftsE* cell division mutants of *Escherichia Coli* during temperature shift experiments. *J Bacteriol* **170**:1533-40.
241. Thanbichler, M., and L. Shapiro. 2008. Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**:28-40.
242. Thibault, G., Y. Tsitrin, T. Davidson, A. Gribun, and W. A. Houry. 2006. Large nucleotide-dependent movement of the N-terminal domain of the ClpX chaperone. *Embo J* **25**:3367-76.
243. Thibessard, A., A. Fernandez, B. Gintz, N. Leblond-Bourget, and B. Decaris. 2002. Effects of *rodA* and *pbp2b* disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol* **184**:2821-6.
244. Thompson, L. S., P. L. Beech, G. Real, A. O. Henriques, and E. J. Harry. 2006. Requirement for the cell division protein DivIB in polar cell division and engulfment during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:7677-85.
245. Tian, H., D. Boyd, and J. Beckwith. 2000. A mutant hunt for defects in membrane protein assembly yields mutations affecting the bacterial signal recognition particle and Sec machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4730-5.
246. Tormo, A., J. A. Ayala, M. A. de Pedro, M. Aldea, and M. Vicente. 1986. Interaction of FtsA and PBP3 proteins in the *Escherichia Coli* septum. *J Bacteriol* **166**:985-92.
247. Tsao, D. H., A. G. Sutherland, L. D. Jennings, Y. Li, T. S. Rush, 3rd, J. C. Alvarez, W. Ding, E. G. Dushin, R. G. Dushin, S. A. Haney, C. H. Kenny, A. K. Malakian, R. Nilakantan, and L. Mosyak. 2006. Discovery of novel inhibitors of the ZipA/FtsZ complex by NMR fragment screening coupled with structure-based design. *Bioorg Med Chem* **14**:7953-61.
248. Tuomanen, E. I., T. J. Mitchell, D. A. Morrison, and B. G. Spratt. 2004. The pneumococcus. ASM Press, Washington.
249. Ueki, M., M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino, and M. Matsuhashi. 1992. *Escherichia Coli* *mraR* gene involved in cell growth and division. *J Bacteriol* **174**:7841-3.
250. Urbanus, M. L., P. A. Scotti, L. Froderberg, A. Saaf, J. W. de Gier, J. Brunner, J. C. Samuelson, R. E. Dalbey, B. Oudega, and J. Luijck. 2001. Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep* **2**:524-9.
251. Ursinus, A., F. van den Ent, S. Brechtel, M. de Pedro, J. V. Holtje, J. Lowe, and W. Vollmer. 2004. Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **186**:6728-37.

252. **Valent, Q. A., P. A. Scotti, S. High, J. W. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, W. Wintermeyer, B. Oudega, and J. Luirink.** 1998. The *Escherichia Coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *Embo J* **17**:2504-12.
253. **van den Ent, F., and J. Lowe.** 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *Embo J* **19**:5300-7.
254. **van den Ent, F., T. M. Vinkenvleugel, A. Ind, P. West, D. Veprintsev, N. Nanninga, T. den Blaauwen, and J. Lowe.** 2008. Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ. *Mol Microbiol* **68**:110-23.
255. **Varon, E., and L. Gutmann.** 2006. Rapport d'activité - Epidémiologie 2005. Centre National de Recherche des Pneumocoques.
256. **Vicente, M., and A. I. Rico.** 2006. The order of the ring: assembly of *Escherichia Coli* cell division components. *Mol Microbiol* **61**:5-8.
257. **Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier, and S. Foster.** 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**:259-86.
258. **Wadsworth, K. D., S. L. Rowland, E. J. Harry, and G. F. King.** 2008. The divisomal protein DivIB contains multiple epitopes that mediate its recruitment to incipient division sites. *Mol Microbiol* **67**:1143-55.
259. **Walsh, C.** 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* **1**:65-70.
260. **Wang, L., M. K. Khattar, W. D. Donachie, and J. Lutkenhaus.** 1998. FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **180**:2810-6.
261. **Wang, L., and J. Lutkenhaus.** 1998. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol* **29**:731-40.
262. **Wang, X., J. Huang, A. Mukherjee, C. Cao, and J. Lutkenhaus.** 1997. Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol* **179**:5551-9.
263. **Wang, X., and J. Lutkenhaus.** 1993. The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol* **9**:435-42.
264. **Weart, R. B., S. Nakano, B. E. Lane, P. Zuber, and P. A. Levin.** 2005. The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol Microbiol* **57**:238-49.
265. **Weiss, D. S., J. C. Chen, J. M. Ghigo, D. Boyd, and J. Beckwith.** 1999. Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol* **181**:508-20.
266. **Weiss, D. S., K. Pogliano, M. Carson, L. M. Guzman, C. Fraipont, M. Nguyen-Disteche, R. Losick, and J. Beckwith.** 1997. Localization of the *Escherichia Coli* cell division protein FtsI (PBP3) to the division site and cell pole. *Mol Microbiol* **25**:671-81.
267. **Wissel, M. C., J. L. Wendt, C. J. Mitchell, and D. S. Weiss.** 2005. The transmembrane helix of the *Escherichia Coli* division protein FtsI localizes to the septal ring. *J Bacteriol* **187**:320-8.
268. **Woldringh, C. L., E. Mulder, J. A. Valkenburg, F. B. Wientjes, A. Zaritsky, and N. Nanninga.** 1990. Role of the nucleoid in the toporegulation of division. *Res Microbiol* **141**:39-49.
269. **Wu, L. J., and J. Errington.** 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**:915-25.
270. **Yang, J. C., F. Van Den Ent, D. Neuhaus, J. Brevier, and J. Lowe.** 2004. Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN. *Mol Microbiol* **52**:651-60.
271. **Yim, L., G. Vandenbussche, J. Mingorance, S. Rueda, M. Casanova, J. M. Ruyschaert, and M. Vicente.** 2000. Role of the carboxy terminus of *Escherichia Coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J Bacteriol* **182**:6366-73.
272. **Young, K. D.** 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:660-703.
273. **Yu, X. C., and W. Margolin.** 1997. Ca<sup>2+</sup>-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *Embo J* **16**:5455-63.
274. **Yu, X. C., A. H. Tran, Q. Sun, and W. Margolin.** 1998. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia Coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol* **180**:1296-304.
275. **Zapun, A., T. Vernet, and M. G. Pinho.** 2008. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**:345-60.

## Résumé

*S. pneumoniae* est un pathogène qui cause plus d'un million de mort par an dans le monde. L'étude de la division bactérienne, processus essentiel à la propagation des bactéries, peut fournir de nouvelles cibles thérapeutiques. DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL sont trois protéines centrales de la division bactérienne. Nous avons pu démontrer que ces protéines forment un complexe ternaire essentiel à la division du pneumocoque. La protéine DivIB n'est pas essentielle en milieu riche. Son absence entraîne des défauts de séparation des cellules et confirme son rôle dans la division du pneumocoque. Cependant, DivIB est essentielle à la viabilité du pneumocoque en milieu défini. Par ailleurs, nous confirmons que DivIB est nécessaire à la stabilité de FtsL *in vivo* et suggérons que l'essentialité de DivIB est reliée à la stabilité relative de FtsL. Une étude de la fonctionnalité des domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la partie extracellulaire de DivIB a révélé que le domaine  $\beta$  complet est nécessaire pour restaurer le phénotype sauvage de la souche. Enfin, la délétion de *divIB* accentue la sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames renforçant l'idée d'un rôle de DivIB dans le métabolisme de la paroi lors de la division. DivIB semble donc être une cible de choix pour rétablir l'efficacité des antibactériens les plus testés et les plus utilisés au monde, les  $\beta$ -lactames.

## Abstract

*S. pneumoniae* causes more than one million deaths per year worldwide. Understanding cell division, a vital process for bacteria, is important in order to find innovative therapeutic molecules. DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB and FtsL are central proteins of the divisome assembly to the septum. We have demonstrated that they form an essential ternary complex for pneumococcal division. Contrary to both *ftsL* and *divIC*, *divIB* is not essential for viability and growth of *S. pneumoniae* in rich medium. However, the *divIB* null mutant does not grow in chemically defined medium. In the absence of DivIB and protein synthesis, the partner FtsL is rapidly degraded, whereas other division proteins are not affected, pointing to a role of DivIB in stabilizing FtsL. This is further supported by the finding that an additional copy of *ftsL* restores growth of the *divIB* null mutant in defined medium. Functional mapping of the three distinct  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -domains of the extracellular region of DivIB revealed that a complete  $\beta$  domain is required to fully rescue the deletion mutant. Most importantly, the deletion of *divIB* increases the susceptibility to  $\beta$ -lactams, more evidently in resistant strain, suggesting a function in cell wall synthesis. DivIB would be a good target to restore the efficiency of the most used antibiotics in the world, the  $\beta$ -lactams.